

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Kateřina Hrnčířová

**Role hlodavců rodu *Arvicanthis* jako rezervoárů *Leishmania major*:
xenodiagnostika a experimentální infekce flebotomy**

Role of rodents of the genus *Arvicanthis* in *Leishmania major* maintenance:
xenodiagnosis and experimental transmission of infections

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Jovana Sádlová, PhD.

Praha 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 08. 2017

Bc. Kateřina Hrnčířová

Poděkování

Velmi děkuji Jovaně Sádlové za vedení mé závěrečné práce, její pomoc s pokusy, obrovskou ochotu a stále dobrou náladu. Děkuji všem z laboratoře profesora Petra Volfa, kteří se jakýmkoliv způsobem podíleli na výsledcích této práce. Především Táně Spitzové, Báře Vojtkové, Terce Leštinové a Honzovi Votýpkovi.

V neposlední řadě děkuji rodičům za možnost studovat a životnímu partnerovi za podporu při studiu.

Seznam zkratek

<i>A.</i>	<i>Arvicanthi</i>
ELISA	Enzyme – Linked Immuno Sorbent Assay
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Technique
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
<i>M.</i>	<i>Mastomys</i>
<i>Me.</i>	<i>Meriones</i>
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
PI	po infekci
<i>Ps.</i>	<i>Psammomys</i>
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<i>R.</i>	<i>Rhombomys</i>

ABSTRAKT

Kožní leishmanióza je nejčastější z klinických forem onemocnění člověka působené parazity rodu *Leishmania*. Paraziti jsou mezi hostiteli přenášeni sáním samic dvoukřídlého hmyzu rodu *Phlebotomus* v oblasti Starého světa a *Lutzomyia* v oblasti Nového světa. Jedním z hlavních původců kožní leishmaniózy Starého světa je *Leishmania major*. Onemocnění působené tímto druhem je zoonózou, kde jako rezervoároví hostitelé slouží hlodavci. Parazit dlouhodobě koluje mezi rezervoárovými hlodavci a flebotomy a člověk se stává jen náhodným hostitelem v případě výskytu v ohnisku nákazy.

Hlodavci rodu *Arvicanthis* patří mezi nejhojnější hlodavce afrického kontinentu, s původním výskytem v Etiopii, odkud se rozšířili na podstatné území subsaharské Afriky a delty řeky Nil. V endemických lokalitách kožních i viscerálních leishmanióz jsou velice hojní a splňují i další kritéria rezervoárového hostitele, včetně opakovaných nálezů jedinců infikovaných *L. major* a dalšími druhy leishmanií. Dosud ovšem nebylo potvrzeno, jakou roli v koloběhu onemocnění hrají a zda nejsou jen náhodným hostitelem tohoto parazita.

Pro tuto práci byl získán druh *A. neumanni*, který se vyskytuje především ve východní Africe, na území Etiopie, Somálska, Keni a Tanzánie. Jedinci z pokusných skupin byly experimentálně nakaženi třemi různými izoláty *L. major* a pomocí xenodiagnostiky byla testována jejich infektivita pro flebotomy druhu *P. duboscqi*, přirozeného přenašeče *L. major* v subsaharské Africe.

Dále byla pozorována vnější manifestace onemocnění (tvorba kožních lézí), rozvoj infekce a distribuce *L. major* do dalších tkání metodou kvantitativní PCR a sledována tvorba protilátek proti *L. major* v průběhu pokusu metodou ELISA. Schopnost *L. major* dokončit v *A. neumanni* životní cyklus byla testována pomocí sání nenakažených flebotomů na jedincích infikovaných v předchozím sáním experimentálně nakaženými flebotomy. Hodnocena byla také atraktivita *A. neumanni* pro *P. duboscqi*, fekundita a mortalita samic nasátých na *A. neumanni* a dalších dvou druzích myšovitých hlodavců.

Experimentální infekce *A. neumanni* prokázaly, že tento druh hlodavce může sloužit jako hostitel *L. major*. Izoláty pocházející ze Senegalu přetrvaly v místě inokulace do 20. týdne po infekci, aniž by zvířata vykazovala výrazné známky onemocnění. Mezi 5. a 10. týdnem po infekci byli někteří pokusní jedinci schopni infikovat sající flebotomy.

Klíčová slova: xenodiagnostika, leishmanióza, *Phlebotomus*, *Leishmania major* rezervoárový hostitel, *Arvicanthis*

ABSTRACT

A cutaneous leishmaniasis is the most common clinical form of human disease caused by parasite of the genus *Leishmania*. They are transmitted between the hosts by haematophagous females of dipteran sand flies of the genus *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World. One of the major agents of cutaneous leishmaniasis in the Old World is *Leishmania major*. The disease caused by this species is a zoonosis where rodents act as reservoir host. The parasite long time circulates between reservoir rodents and sand flies, while humans are infected only accidentally in the focus of infection.

Rodents of the genus *Arvicanthis* belongs to the most abundant in the African continent. The genus has evolved in Ethiopia from where it expanded to a major part of Sub – Saharan Africa and the delta of the river Nile. These rodents are very abundant in endemic locations of cutaneous and visceral leishmanias and fulfil many reservoir host criterias including repeated field findings of individuals infected by *L. major* and another *Leishmania* species in nature. However, their role in the disease cycle remains to be confirmed.

A. neumanni used in this study is an East African species spread from Ethiopia and Somalia to Kenya and Tanzania. Animals were experimentally infected with three different *L. major* isolates and their infectivity for *P. duboscqi* (a natural vector of *L. major* in Sub – Saharan Africa region) was tested by xenodiagnosis.

Additionally, external manifestations of the disease (skin lesion formation) were observed. Development of infection and distribution of *L. major* to several different tissues were tested by quantitative PCR. Production of antibodies against *L. major* during the course of infection was evaluated using ELISA. The ability of *L. major* to complete the life cycle in *A. neumanni* was tested by feeding of naive sand flies on *Arvicanthis* infected previously by experimentally infected sand flies. Also attractiveness of *A. neumanni* and two other rodent species for *P. duboscqi* and the fecundity and mortality of females after blood meal was evaluated.

Experimental infections of *A. neumanni* have shown that this species of rodent can serve as a *L. major* host. Isolates from Senegal persisted on the site of inoculation until the 20th week post infection and animals did not show significant signs of the disease. Some individuals of *A. neumanni* were able to infect sand flies between 5th and 10th week post infection.

Key words: xenodiagnosis, leishmaniasis, *Phlebotomus*, *Leishmania major*, reservoir host, *Arvicanthis*

Obsah

1	Úvod a cíle práce	8
2	Literární přehled	9
2.1	Leishmaniózy.....	9
2.1.1	Kutánní leishmanióza (CL)	12
2.1.2	Zoonotická kutánní leishmanióza (ZCL).....	15
2.1.3	Epidemiologie kutánní leishmaniózy	16
2.2	Rezervoároví hostitelé leishmanióz	18
2.2.1	Role hlodavců jako rezervoárů infekce <i>L. major</i>	23
2.3	Biologie hlodavců rodu <i>Arvicanthis</i>	24
2.4	Preference rezervoárových hostitelů krevsajícími vektory a vliv krve hostitelů na fekunditu vektorů	26
2.5	Xenodiagnostika	29
3	Materiál a metodika	31
3.1	Složení použitých roztoků	31
3.2	Chov flebotomů	31
3.3	Experimentální infekce flebotomů.....	32
3.3.1	Kultivace leishmanií	32
3.3.2	Infekční sání flebotomů.....	33
3.3.3	Příprava slinných žláz	34
3.3.4	Pitvy střev infikovaných flebotomů.....	34
3.4	Chov <i>Arvicanthis neumanni</i>	35
3.5	Experimentální infekce hlodavců	36
3.6	Xenodiagnostické pokusy a sledování infekce <i>L. major</i>	36
3.6.1	Pokusná skupina <i>A. neumanni</i> s infekcí <i>L. major</i> FVI	36

3.6.2	Pokusná skupina <i>A. neumanni</i> s infekcí <i>L. major</i> LV 109.....	37
3.6.3	Pokusná skupina <i>A. neumanni</i> s infekcí <i>L. major</i> LV 110.....	38
3.6.4	Pokusná skupina <i>A. neumanni</i> s infekcí <i>L. major</i> LV 109 z kultury.....	38
3.7	Sledování schopnosti <i>L. major</i> dokončit životní cyklus v <i>A. neumanni</i>	39
3.8	Testování preference různých druhů hlodavců flebotomy druhu <i>P. duboscqi</i>	39
3.9	Testování vlivu krve hostitele na mortalitu a fekunditu samic <i>P. duboscqi</i>	40
3.10	Izolace DNA z tkání <i>A. neumanni</i> a qPCR	41
3.11	Testování tvorby protilátek proti <i>L. major</i> metodou ELISA	42
3.12	Statistika	43
4	Výsledky	44
4.1	Xenodiagnostické pokusy a sledování infekce <i>L. major</i>	44
4.1.1	<i>A. neumanni</i> s infekcí <i>L. major</i> FVI	44
4.1.2	<i>A. neumanni</i> s infekcí <i>L. major</i> LV 109.....	46
4.1.3	<i>A. neumanni</i> s infekcí <i>L. major</i> LV 110.....	49
4.1.4	<i>A. neumanni</i> s infekcí <i>L. major</i> LV 109 z kultury.....	50
4.2	Sledování schopnosti <i>L. major</i> dokončit životní cyklus v <i>A. neumanni</i>	52
4.3	Preference různých druhů hlodavců flebotomy druhu <i>P. duboscqi</i>	54
4.4	Vliv krve hostitelů na mortalitu a fekunditu samic <i>P. duboscqi</i>	55
4.5	Tvorba protilátek proti <i>L. major</i>	58
5	Diskuze	59
6	Závěrečné shrnutí	67
7	Použitá literatura	69
8	Přílohy	79

1 Úvod a cíle práce

Leishmania major (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) je parazitem kolujícím mezi převážně norovými hlodavci a vektory rodu *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) v mnoha zemích tropického a subtropického pásma Starého světa. Prokázanými vektory jsou africký druh *P. duboscqi*, používaný v této práci a blízce příbuzný *P. papatasi*. V případě, že se v blízkosti nor hlodavců vyskytují lidská sídla nebo se člověk dostane do ohniska nákazy, mohou nakažení flebotomové sát a přenášet *L. major* i na člověka. Onemocnění je u člověka nazýváno zoonotická kožní leishmanióza a projevuje se ulcerujícími kožními lézemi v místě sání nakaženého flebotoma. Tyto léze se u imunokompetentních osob hojí většinou spontánně v průběhu několika měsíců jizvou. Dochází tedy k znetvoření pokožky a vzhledem k tomu, že flebotomové sají hlavně na odhalených částech těla jako je obličej a ruce, může u postižených osob docházet ke stigmatizaci ve společnosti.

Několik druhů hlodavců je prokázáno jako rezervoárový hostitel v oblastech od severní Afriky po Střední Asii a Írán, kde jsou to hlodavci z podčeledi Gerbillinae (pískomilové). V subsaharské Africe je identita rezervoárových hostitelů méně jasná. Izoláty *Leishmania* sp. byly získány z mnoha druhů zvířat, jejich skutečný význam v přenosu leishmanií je ale nutno potvrdit. Jedním z nejdůležitějších potencionálně rezervoárových hostitelů jsou hlodavci rodu *Arvicanthis*, kteří patří mezi nejhojnější africké hlodavce s širokým areálem rozšíření. Je to živočich obývající nory, které jsou ideálním prostředím pro vývoj flebotomů. Z hlodavců rodu *Arvicanthis* byly získány izoláty *L. major* a také *L. donovani*, původce viscerální leishmaniózy ve východní Africe.

Cílem této práce je ověřit potenciál druhu *Arvicanthis neumanni* sloužit jako rezervoár *Leishmania major* a to:

- sledováním infekivity experimentálně nakažených hlodavců *A. neumanni* pro flebotomy druhu *P. duboscqi* pomocí xenodiagnostických pokusů.
- sledováním rozvoje infekce a distribuce parazita v těle hostitele pomocí qPCR a sledováním vnější manifestace onemocnění (tvorba lézí).
- sledováním zda *L. major* dokončí v *A. neumanni* životní cyklus pomocí sání nenakažených flebotomů na jedincích infikovaných předchozím sáním experimentálně nakažených flebotomů.
- testováním atraktivity *A. neumanni* pro přenašeče *P. duboscqi* pomocí preferenčních pokusů a sledováním mortality a fekundity nasátých samic flebotomů.

2 Literární přehled

2.1 Leishmaniózy

Leishmaniózy jsou skupinou onemocnění obratlovců, včetně člověka, která působí obligátně intracelulární prvoci rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Onemocnění je přenášeno hematofágními samicemi flebotomů rodu *Phlebotomus* Rondani & Berte, 1840 ve Starém světě a *Lutzomyia* França, 1924 v Novém světě (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Okolo padesáti druhů (z několika stovek) flebotomů je schopno přenést toto onemocnění a je známo více než dvacet druhů leishmanií schopných infikovat člověka (Mansueto *et al.*, 2014). Mezi kompetentními druhy flebotomů a leishmaniemi, které přenáší se vyvinuly specifické vztahy, založené na molekulárních mechanismech a interakcích, které umožňují přežití a množení parazita uvnitř střeva flebotomů a nákazu dalšího hostitele. Tyto molekulární interakce mají za následek, že jen určitý druh flebotoma je schopen přirozeného přenosu konkrétního druhu leishmanie v přírodě (shrnutí v Sacks, Kamhawi, 2001; Ramalho – Ortigao *et al.*, 2010).

Většina druhů leishmanií patří do skupiny Suprapylaria, vyvíjející se v mesenteronu a stomodeu flebotomů¹ (shrnutí v Kamhawi, 2006). Níže je popsán pouze životní cyklus skupiny Suprapylaria, protože tento typ vývoje má *L. major* používaná v práci pro experimentální infekce.

Infekce flebotoma vzniká při nasátí krve z infikovaného hostitele. Flebotomové patří mezi thelhofágní hmyz, takže při sání krve vytvářejí drobnou ránu, do které se začnou stahovat monocyty a makrofágy. U nakaženého jedince tyto imunitní buňky obsahují amastigotní stádia leishmanií ve fagolysozomu. Amastigotní stádia v mesenteronu flebotoma transformují do stádií procyklických promastigotů a replikují se v nasáté krvi uvnitř peritrofické matrix. Za několik dní se procyklické promastigoty transformují na velmi pohyblivé nektomonády – tato stádia unikají z peritrofické matrix, přichycují se k epitelu střeva a dále anteriorně migrují ke stomodeální valvě flebotoma v thorakální části střeva. V oblasti thorakálního mesenteronu dojde k dalšímu množení a formování leptomonád. Z leptomonád následně vznikají haptomonády, které jsou uchyceny na stomodeální valvě (kde přispívají k její degeneraci) a

¹ Druhou skupinou je Peripylaria, která se od Suprapylaria a Hypopylaria odlišuje vývojem v zadní části střeva flebotomů (proktodeu) a patří sem například *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

infekčních vysoce pohyblivá metacykličtí promastigoti – stádia připravená k infekci dalšího obratlovčího hostitele (Obrázek 1, 2). Důležitým mechanismem při přenosu je „blokace střeva“ sekrecí molekul PSG (promastigote secretory gel) parazity. Flebotom s takto blokováným střevem (PSG spolu s hroznem haptomonád a leptomonád vytváří v thorakálním mesenteronu „zátku“) a nefunkční stomodeální valvou (ta je poškozena chitinázami leishmanií) špatně mechanicky nasává krev z dalšího hostitele a to vede k regurgitaci infekčních metacyklických forem parazita do obratlovčího hostitele a jeho nákaze (shrnuto v Kamhawi, 2006; Bates, 2007)

Desjeux (2004) uvádí, že flebotom nakažený nějakým druhem rodu *Leishmania* se stává infekční pro dalšího hostitele za 8 – 20 dní. Kamhawi (2006) tvrdí, že průměrná doba vývoje leishmanií ve flebotomovi je 6 – 9 dní v závislosti na druhu.

Onemocnění se vyskytuje především v tropických, subtropických oblastech a také v některých oblastech mírného pásma a je endemické v 98 zemích světa (Kamhawi, 2006, Alvar *et al.*, 2012). Světová zdravotnická organizace (WHO) označila leishmaniózu jako šesté nejvýznamnější onemocnění v tropech a subtropích (Feiz – Haddad *et al.*, 2015).

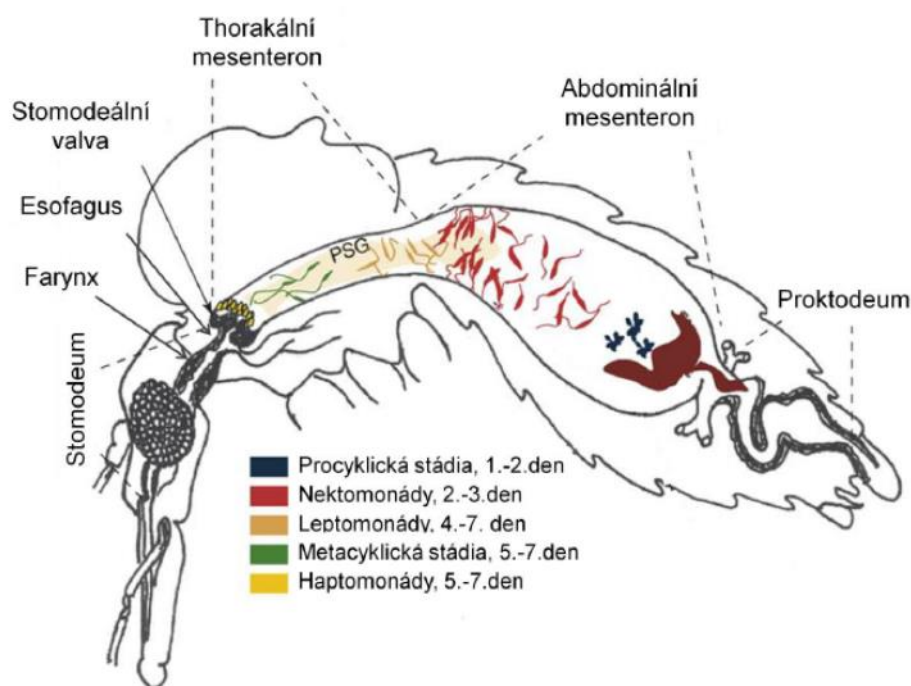
Projevy onemocnění záleží na druhu parazita a imunitní odpovědi hostitele. Spektrum klinických příznaků se pohybuje od asymptomatických infekcí po leishmaniózy s méně vážnými klinickými příznaky – kutánní leishmanióza přes vážnější mukokutánní formy až fatální viscerální formy leishmanióz (kala - azar). Viscerální leishmanióza vzniká, když jsou nakaženy makrofágy lokalizované ve vnitřních orgánech, především v kostní dřeni, játrech a slezině (Chappuis *et al.*, 2007). Onemocnění viscerotropními druhy leishmanií se projevuje především opakovanými horečkami, splenomegálií, hepatomegálií, lymfadenopatií, anémií a ztrátou hmotnosti a bez léčby vede ke smrti (Desjeux, 2004).

Celosvětově nejrozšířenější formou je leishmanióza kutánní, manifestující se chronickou, nebolestivou lézí (Kelly *et al.*, 2012; Mansueto *et al.*, 2014). Kutánní leishmanióza se vyskytuje od Ameriky, přes oblast Středomoří, západní Asie a oblast Středního východu až do Střední Asie, Íránu a Indie. Viscerální forma leishmaniózy se vyskytuje především v rurálních a suburbánních oblastech Indie, Bangladéše, Sudánu, Jižního Sudánu, Etiopie a Brazílie (Desjeux, 2004; Alvar *et al.*, 2012).

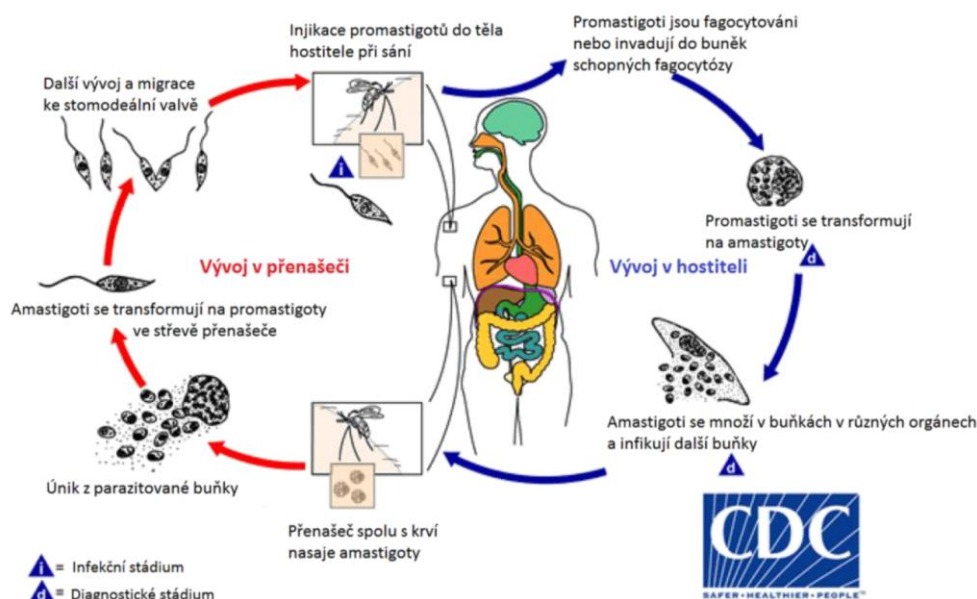
Zlatým standardem v diagnostice leishmanióz je přímý průkaz amastigotních stádií v různých klinických vzorcích. Pro diagnostiku kutánních a mukokutánních leishmanióz je obvykle využíváno vyšetření Giemsou barvených preparátů seškrabů kůže pod světelným mikroskopem nebo vyšetření sklíčka s otiskem získaným ze zánětlivých okrajů kožní léze.

V diagnostice viscerálních leishmanióz (VL) je nejčastěji využíváno mikroskopické vyšetření kostní dřeně nebo aspirátu ze sleziny. Aspirát ze sleziny má více než 95% diagnostickou citlivost. Je tak zlatým standardem v diagnostice VL, ale je omezen kontraindikacemi, jako je vážná anémie, sklony k nadměrné krvácivosti a těhotenství. Dále jsou využívány sérologické metody – ELISA, IFAT, aj. (Desjeux, 2004; Murray *et al.*, 2005).

Většina kožních lézí (způsobované *L. major*, *L. tropica* aj.) je vyhojena bez léčby jizvou během několika měsíců. V případě dlouhodobě přetrvávající velkých lézí nebo výskytu lézí blízko kloubů je podáván lék první volby – pětimočný antimon. Léčba je nutná hrozí – li rozsev leishmanií na sliznice a propuknutí mukokutánní leishmaniózy způsobené především novosvětskými leishmaniemi Latinské Ameriky z podrodu *Viannia*, například *L. (V.) braziliensis*. V případě viscerálních leishmanióz (způsobované druhy *L. donovani infantum*, *L. donovani donovani*) je léčba nutná a je nejčastěji podáván intramuskulárně nebo intravenózně pětimočný antimon a především v Evropě, USA a Indii intravenózně Amfotericin B (Ashford, 2000; Mansueto *et al.*, 2014). V Indii vlivem špatného léčebného schématu (podávání nízkých dávek, předčasného ukončení léčby, aj.) došlo k výraznému zvýšení rezistence na pětimočný antimon a například v hyperendemické oblasti Bihar v severní Indii, neodpovídá na léčbu VL pětimočným antimonem 50 – 65 % lidí (Sundar, 2001).



Obrázek 1: Vývojový cyklus *Leishmania* sp. ve flebotomovi (upraveno a převzato z Kamhawi, 2006)



Obrázek 2: Životní cyklus *Leishmania* sp.

(upraveno a převzato z cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html)

2.1.1 Kutánní leishmanióza (CL)

Kutánní leishmanióza (CL) je nejčastější formou onemocnění s nejméně závažnými klinickými příznaky projevující se ulcerativní nebo nodulární lézí v místě sání infikovaného flebotoma. V 86 – 98 % případů se léze spontánně vyhojí od tří měsíců do dvou let (Goto, Lindoso, 2010; McGwire, Satoskar, 2014). Kutánní forma leishmaniózy je infekcí dermálních makrofágů, což vyvolává intenzivní zánětlivou imunitní odpověď a ulceraci pokožky nakažených hostitelů. Závažnost příznaků je závislá na druhu parazita a imunitní odpovědi hostitele (Nylen, Eidsmo, 2014).

Rod *Leishmania* je dnes rozdělen na čtyři uznávané podrody a z toho zástupci tří podrodů působí CL u lidí: *Leishmania*, *Viannia*, *Mundinia* (Espinosa *et al.*, 2016). Leishmanie z podrodu *Viannia*, vyskytující se v Latinské Americe, vytvářejí agresivněji ulcerující léze a mohou přecházet až do mukokutánní formy onemocnění (Gomes *et al.*, 2008). Původci kožních leishmanióz jsou ve Starém světě (Asie, Afrika, Evropa): *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) infantum* z podrodu *Leishmania* a *L. (M.) martiniquensis* a *Leishmania (M.)* sp. z Ghany z podrodu *Mundinia*. V Novém světě (Latinská Amerika) jsou to: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis* z podrodu *Leishmania* a *L. braziliensis* komplex (s dvěma druhy *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana*), *L. guyanensis* komplex (s třemi

druhy *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) panemensis*), *L. naiffi* komplex (s jedním druhem *L. (V.) naiffi*) a *L. lainsoni* komplex (s jedním druhem *L. (V.) lainsoni*) z podrodu *Viannia*. (Boisseau-Garsaud *et al.* 2000; Mansueto *et al.*, 2014; Kwakye-Nuako *et al.* 2015)

Existuje několik klinických forem kutánní leishmaniózy: **lokalizovaná CL (LCL)**, působená především druhy Starého světa *L. major*, *L. tropica*, *L. sp.* z Ghany, *L. martiniquensis* a *L. aethiopica* (tento druh může způsobit recidivující léze několik měsíců až let po zhojení), **difúzní CL (DCL)**, působená druhy *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. martiniquensis* a *L. aethiopica*, **mukokutánní forma (MCL)**, působená ve většině případů *L. (V.) braziliensis* (dále *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) amazonensis* a výjimečně druhy Starého světa u imunodeficitních lidí) a **post kala – azar dermální forma (PKDL)**, která se může vyvinout v rámci dvou let po léčbě viscerální formy onemocnění *L. donovani*. Nejvyšší prevalenci má lokalizovaná kutánní leishmanióza (Boisseau-Garsaud *et al.* 2000; Goto, Lindoso, 2010; McGwire, Satoskar, 2014; Kwakye-Nuako *et al.* 2015; Abdoli *et al.*, 2017).

Dle Kelly *et al.* (2012) se na počátku onemocnění vytvoří malá (5 - 10 mm) červená papula v místě sání nakaženého vektora. Tento kožní útvar se vyvíjí v nebolestivý erytematózní nodul, který progresivně ulceruje v průběhu týdnů až měsíců. U imunokompetentních osob dojde obvykle i bez léčby v průběhu několika měsíců ke spontánnímu zhojení. V místě zhojení dojde k depigmentaci a vytvoření výrazné jizvy a znetvoření pokožky. Komplikací hojení může být bakteriální infekce, která se projeví bolestivostí léze (Mansueto *et al.*, 2014). Problém jsou recidivující léze, které jsou obtížně hojitelné a dlouhotrvající, například u infekcí *L. (L.) aethiopica* (Desjeux, 2004). U lidí s imunodeficitem (HIV aj.) může vzniknout difúzní forma CL při které se tvoří noduly po celém těle, nejen v místě primární infekce. Ve srovnání s lokalizovanou CL je difúzní forma obtížně léčitelná a noduly se nevyhojují spontánně (Peters, Killick-Kendrick, 1987). Tento typ onemocnění se vyskytuje u nálezů způsobených *L. (V.) amazonensis* a *L. (L.) aethiopica* (Ashford, 2000). DCL je známá z Jižní a Střední Ameriky a Etiopie (Goto, Lindoso, 2010). Nákazy způsobené leishmaniami z podrodu *Viannia* vyskytující se v Latinské Americe mohou z kožní léze hematogenní a lymfogenní cestou přecházet na sliznice a způsobovat jejich vážný a destruktivní zánět – mukokutánní leishmaniózu. Pravděpodobnost přechodu z kožní do mukokutánní formy leishmaniózy stoupá, když se léze s parazity nachází na hlavě a krku v blízkosti nosu a úst, léze jsou dlouhotrvající a velkých rozměrů bez adekvátní léčby, zároveň je postižený mužského pohlaví, má imunodeficit nebo je ve špatném výživovém stavu (Mansueto *et al.*, 2014).

K diagnostice kutánních a mukokutánních leishmanióz je možno vyšetřit vzorky z kůže obarvené Giemsou (stěry z okrajů lézí, vzorky biopsie léze) pod světelným mikroskopem, což umožňuje vizualizaci amastigotních forem leishmanií a přináší rychlé výsledky. Tento typ diagnostiky je nejvíce používaný, ale nevýhodou je nízká senzitivita, dle Mansueto *et al.* (2014) 14 – 18 %. Dle Goto, Lindoso (2010) 50 – 70% u druhů Starého světa a 15 – 30% u druhů Nového světa. Dále lze vyšetřovat histologické vzorky lézí obarvené hematoxylin eosinem pod světelným mikroskopem, senzitivita u této metody je 33 - 57 %. Typickým patologickým nálezem v histologickém řezu je granuloma a amastigoti leishmanií. Další použitelnou metodou pro diagnostiku je kultivace ve speciálním médiu (NNN médium, 3 týdny) z aspirátu získaného z léze pomocí injekční jehly nebo z biopsie kůže. Senzitivita je 58 – 62 %. Této metody se využívá, pokud je potřeba leishmanie izolovat pro druhové určení. Další diagnostickou metodou může být Leishmanin kožní test (Montenegro test), založený na intradermálním podání antigenu *Leishmania* sp. a vytvoření hypersenzitivní kožní reakce v případě positivity testu. Nevýhodou je, že může být negativní v prvních měsících infekce, zároveň ale vykazuje pozitivitu u aktivních CL a MCL. Tento test se používá především v epidemiologických studiích. Goto, Lindoso (2010) uvádí, že není vhodné tento test používat v endemických zemích, protože nerozlišuje mezi probíhající a již proběhlou infekcí, ale může být užitečný v diagnostice leishmaniózy u cestovatelů, kteří se vrátili z endemických zemí. Méně využívanou metodou diagnostiky kožních leishmanióz jsou sérologické testy (ELISA, IFA), které detekují vytvořené protilátky proti *Leishmania* sp. U CL působené druhy Starého světa vykazují sérologické testy nízkou senzitivitu a zkříženou reakci s jinými infekcemi a rutinně se nepoužívají. U MCL jsou dobře použitelné z důvodu intenzivní imunitní odpovědi nakaženého hostitele (ELISA vykazuje 93,3% senzitivitu) a mohou být také užitečné v monitoringu odpovědi na léčbu MCL. Poslední využitelnou metodou je detekce DNA leishmanií pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) ze vzorků kůže a i z jiných biologických materiálů. Tato metoda umožňuje určení druhu a je vysoce senzitivní (98 – 100 %) a specifická (100 %). Vhodné je využívat metodu kvantitativní PCR (qPCR), která umožňuje kromě detekce i kvantifikaci parazitů v odebraném materiálu a je méně náchylná ke kontaminacím než konvenční PCR (Faber *et al.*, 2002; Goto, Lindoso, 2010; Mansueto *et al.*, 2014).

V endemických zemích je často diagnóza stanovena podle klinických příznaků a pokud je to možné i mikroskopickým vyšetřením vzorků z lézí k potvrzení infekce *Leishmania* sp.. Vyšetření klinických vzorků pomocí sofistikovanějších metod je využíváno pouze

v neendemických zemích (Reithinger *et al.*, 2007). Vzhledem k tomu, že léčba je toxická a má mnoho vedlejších nežádoucích účinků, je laboratorní potvrzení nákazy žádoucí (Handler *et al.*, 2015).

Lokalizované léze způsobené druhy Starého světa se většinou neléčí, protože ke zhojení dojde obvykle v průběhu několika měsíců. Může však být zahájena v případě urychlení zhojení léze, redukci jizvy a jako prevence diseminace a relapsu onemocnění (Murray *et al.*, 2005). Vhodná je systémová léčba při vícečetných a velkých lézích nad 4 cm, výskytu v blízkosti kloubů a u imunosuprimovaných osob. Dále u leishmaniózy způsobených především *L. (V.) braziliensis* kvůli možnosti propuknutí mukokutánní formy onemocnění a u osob trpících post kala azar kutánní leishmaniózou (PKDL) (Handler *et al.*, 2015). Léčba je dostupná od začátku 20. století a léčivo tak zvané první volby je nejdéle používaný pětimocný antimon dostupný ve dvou formách, jehož mechanismus účinku není přesně znám, ale ovlivňuje glykolýzu a aktivitu mastných kyselin v procesu oxidativní fosforylace. Dále Amphotericin B ve čtyřech formách, působící na ergosterol v buněčné membráně leishmanií a zvyšující její permeabilitu a Pentamidine, který působí na DNA syntézu leishmanií. Liposomální Amphotericin B je používán především ve vyspělých zemích a v zemích s rezistencí na pětimocný antimon (severovýchodní Indie). Dalšími použitelnými léčivy jsou Miltefosine, Paromomycin aj. (Balaña - Fouce *et al.*, 1998; Goto, Lindoso, 2010). Pacienti po vyléčení infekce získávají imunitu proti onemocnění na několik let (Ashford, 2000).

2.1.2 Zoonotická kutánní leishmanióza (ZCL)

Dle Ashford (2000) jsou všechny leishmaniózy u člověka zoonotického původu. Dle stejného autora i ty druhy leishmanií, které dnes kolují převážně jen mezi lidmi, měli původně zvířecí rezervoár. Postupně se ale přizpůsobily pouze na koloběh mezi lidmi bez potřeby zvířecího rezervoárového hostitele a ten z jejich koloběhu vymizel.

Většina rezervoárových zvířat (zdroj infekce) patří mezi hlodavce nebo psovitě šelmy (Faber *et al.*, 2002). Dále mohou v životním cyklu figurovat různá jiná divoká a domácí zvířata nebo je rezervoárovým hostitelem pouze člověk (antroponóza) (Kamhawi, 2006). Jako antroponózy jsou tradičně uváděny infekce *L. tropica*, původce kutánní formy leishmaniózy a *L. donovani donovani*, původce viscerální formy onemocnění (Reithinger *et al.*, 2007). Ovšem i u obou těchto druhů se dnes již uznává zapojení rezervoárových zvířecích hostitelů alespoň v některých oblastech jejich výskytu (Yaghoobi – Ershadi *et al.*, 2002; Svobodová *et al.*, 2003; Svobodová *et al.*, 2006, Kassahun *et al.* 2015).

Dynamika onemocnění je úzce spjatá s rozšířením rezervoárových hostitelů a abundancí vektorů, mezi kterými infekce koluje a člověk se stává jen náhodným hostitelem, při proniknutí do míst s výskytem zoonotického cyklu (Chaves, Pascual, 2006). Časným varováním založeným na sledování klimatických dat, vegetačního pokryvu, dynamiky populace hlodavců, mapováním případů aj. lze predikovat a předcházet epidemiím ZCL (Desjeux, 2004). Počty případů v endemických oblastech ZCL korelují s teplotou, množstvím srážek, vzdušnou vlhkostí, délkou období dešťů, rychlostí větru aj. Například zvyšování minimální teploty a vlhkosti zkracuje inkubační periodu patogenu a rychlost vývoje vektora a tím dochází ke zvyšování vektorové kapacity a narůstání počtu případů. Naopak při přetrvávajícím horku a suchu může vektorová kapacita klesat (Bounoua *et al.*, 2013; Al – Jawabreh *et al.*, 2017).

Hlavním původcem ZCL je druh *L. major* – parazit kolující mezi flebotomy a norovými hlodavci aridních a savanových oblastí. Tento druh byl nalezen v severozápadní Indii, v oblastech od severu Afganistánu a severovýchodního Iránu, v pouštích Střední Asie, mezi Uralem a Kaspickým mořem, v Saudské Arábii, přes Jordánsko a Izrael až po severní Afriku a v zemích od Senegalu po Súdán, Etiopii a Keňu (Schlein, Jacobson, 1996). V zemích subsaharské Afriky dochází k nárůstu počtu zaznamenaných případů, mimo jiné u lidí s infekcí HIV (Grammicia, Gradoni, 2005). Prokázanými vektory přenášející nákazu na člověka jsou *P. papatasi* (sever Afriky, Asie, oblast Středomoří), blízce příbuzný druh *P. duboscqi* (subsaharská oblast Afriky) a *P. salehi* (Indie) (Killick – Kendrick, 1990). Ve Střední Asii je u hlodavců častá koinfekce *L. major* s dalšími druhy leishmanií, *L. turanica* a *L. gerbilli*. Strelkova (1996) nepovažuje tyto druhy za patogenní pro člověka. Akhavan *et al.* (2010a) uvádí, že by epidemiologie a přenos druhu *L. turanica* měli být přesto sledovány, právě vzhledem k tomu, že infekci *L. major* u hlodavců obvykle doprovází infekce *L. turanica*.

Pravděpodobnost nákazy člověka v endemických oblastech se zvyšuje například v případě deforestací a s ní souvisejících změnách jako je snižující se biodiverzita savců, na kterých mohou sít flebotomové. Dále při výrazných kultivacích a zásazích do krajiny, při různých zemědělských pracích. Na druhou stranu i urbanizace a s ní spojená vysoká koncentrace lidí a synantropně žijících hlodavců zvyšuje abundanci vektorů a riziko nákazy (Reithinger *et al.*, 2007).

2.1.3 Epidemiologie kutánní leishmaniózy

Kutánní leishmanióza je endemická v 87 zemích světa, z toho 20 zemí patří do oblasti Nového světa (Střední a Jižní Amerika) a 67 zemí do oblasti Starého světa (Evropa, Afrika, Střední

východ, Střední Asie a Indický subkontinent) (WHO, 2014) (Obrázek 3). Leishmanióza je onemocnění dynamické, protože okolnosti přenosu se kontinuálně mění v závislosti na faktorech environmentálních a demografických a v závislosti na lidském chování (Gramiccia, 2011). Uznávány jsou dvě epidemiologické verze přenosu: zoonotická, která zahrnuje zvířecí rezervoár v životním cyklu a antroponotická, kde je člověk hlavním zdrojem infekce pro hmyzího vektora (Seaman *et al.*, 1996).

Devadesát procent případů kožní leishmaniózy se vyskytuje v Afganistánu, Pakistánu, Sýrii, Saudské Arábii, Islámské republice Irán, Alžírsku, Brazílii a Peru (Murray *et al.*, 2005). Alvar *et al.* (2012) k těmto zemím ještě přidává Etiopii, Jižní Sudán, Kolumbii a Kostariku. WHO (2016) udává aktuálně vysokou incidenci ve 12 státech světa (nejvyšší v Syrské arabské republice) z dat, které byly sbírány v roce 2014. Data z mnoha zemí, především ze zemí východní a subsaharské Afriky nejsou vůbec známá nebo jsou významně podhodnocená. Například počet zaznamenaných případů ve východní Africe je 50 a odhadovaná skutečná roční incidence je 90 500 počtu případů (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2016). Výrazné jsou i rozdíly mezi celosvětově zaznamenanými případy a odhadovanou skutečnou roční incidencí onemocnění, konkrétně 214 036 zaznamenaných případů za rok proti 1 213 300 reálně odhadovaných počtů případů (Alvar *et al.*, 2012). V některých endemických oblastech ani neprobíhá sledování nemoci a získávání informací o ní (surveillance) (le Fichoux *et al.*, 1999). WHO (2014) odhaduje 500 000 – 1 000 000 nových případů ročně, ale pouze 19 – 37 % případů je zachyceno zdravotním systémem.

Leishmanióza je onemocnění především v rozvojových zemích, a to hlavně u lidí nejnižšího socioekonomického statusu (Desjeux, 2004). Častý je výskyt v uprchlických táborech, u obyvatel zasažených válkou a mezi vysídlenými obyvateli (Herwaldt, 1999; WHO, 2014). Chudoba je asociovaná s ekologickými faktory, které zvyšují riziko nákazy, jako je například špatný stav obydlí (popraskané hliněné domy s vlhkými podlahami), ve kterých se přes den zdržují flebotomové a po setmění mají volný přístup k sání na hostiteli, dále spaní bez moskytiér, venku a na zemi. Riziko nákazy dále zvyšují ekonomické migrace za prací do oblastí, kde se imunologicky naivní hostitel setkává s nakaženými flebotomy. Chudoba je dále spojena s dalšími infekčními chorobami, nízkou úrovní hygieny a výživy, což má za následek sníženou odolnost a zvyšující se pravděpodobnost klinicky se manifestujícího onemocnění. Dalším důležitým faktorem je nedostupnost zdravotní péče a opožděná možnost léčby, která je finančně náročná a pro chudé obyvatele endemických zemí nedostupná (Alvar *et al.*, 2006).

V endemických zemích je častý chov domácích zvířat, dobytka aj. v blízkosti člověka. Souvislost mezi rizikem nákazy a chovem hospodářských zvířat je poměrně nejasný. Dle Kaabi, Ben – hadj Ahmed (2013) má dva opačné efekty – riziko buď může zvyšovat z důvodu vyšší abundance a přežívání vektorů, ale také snižovat, protože dochází k proporcionálnímu snížení sání na lidských hostitelích. V epidemiologickém modelu ZCL mohou hospodářská zvířata sloužit jako tak zvaný konečný hostitel („dead – end – host“): hlodavec jako hlavní rezervoár infekce, flebotom jako vektor a domácí zvíře, z kterého se nákaza dál nepřenáší. Člověk zde pak slouží jen jako náhodný nebo příležitostný hostitel. Bern *et al.* (2000) uvádí, že přítomnost domácích zvířat není asociována s vyšším rizikem nákazy. Přítomnost některých druhů zvířat může mít dokonce silně protektivní účinek, tzv. zooprofylaktický efekt. Bern *et al.* (2000) uvádí skot a Alexander *et al.* (2002) drůbež. Vyjímkou mezi domácími zvířaty jsou psi, kteří jsou obecně uznávanými rezervoáry několika druhů leishmanií (*L. infantum*, aj.) (Dantas – Torres, 2007).



Obrázek 3: Geografické rozšíření kutánní leishmaniózy (převzato z Gramiccia, Gradoni, 2007)

2.2 Rezervoároví hostitelé leishmanióz

Leishmaniózy jsou skupinou onemocnění, kde klíčovou roli v epidemiologii hrají prakticky vždy divoké druhy savců z různých řádů (Shaw, 1988).

Rezervoár infekce je obecně popisován jako ekologický systém, v kterém trvale přežívá

infekční agens. U onemocnění přenášených hmyzem, jako je leishmanióza, se tento systém skládá z vektora a rezervoárového hostitele. V rezervoárovém hostiteli (RH) infekce dlouhodobě perzistuje a to umožňuje dlouhodobý přenos infekce. V případě, že je nákaza přenosná na člověka, je nazývána zoonóza. Většina leishmanióz patří mezi zoonózy (Ashford, 1996).

RH může být primární nebo sekundární. Primární RH dlouhodobě udržuje koloběh parazita v ekosystému. Sekundární RH je také zdrojem infekce pro vektory, ale není samostatně schopen dlouhodobě udržet biologický cyklus parazita. Sekundární RH může ovšem sloužit jako spojení mezi primárním rezervoárem a náhodným hostitelem. Náhodný hostitel pak neslouží dlouhodobě jako zdroj infekce, ačkoliv může být infekční pro vektora (Chaves *et al.*, 2007).

Shaw (1988) uvádí na příkladu RH viscerální leishmaniózy, co je primární a sekundární rezervoár. Primárním RH jsou divoké psovitě šelmy, například lišky a sekundárním RH pes domácí, který se nakazí od infikovaných flebotomů. Nakažení domácí psi se pak stávají zdrojem infekce pro peridomestické druhy flebotomů, které nákazu přenášejí na další psy a náhodné hostitele (zvířata, lidi).

Haydon *et al.* (2002) RH nerozděluje na primární a sekundární, ale jako rezervoár uvádí jakýkoliv druh schopný přenosu patogena, bez závislosti na tom, jak dlouho je tento hostitel schopný udržet koloběh v ohnisku nákazy.

Silva *et al.* (2005) udává několik kritérií, které by měl splňovat infikovaný hostitel, aby mohl být považován za primárního RH:

- výskyt vektora a hostitele se musí překrývat, častá je speciální závislost vektora na mikrohabitatů vytvářeném hostitelem.
- izolát získaný z RH se shoduje s izolátem získaným z člověka.
- množství parazita v kůži nebo v krvi RH je vysoké natolik, aby došlo ke snadné nákaze vektora.
- prevalence infekce v populaci rezervoáru je značná (vyšší než 20 %).
- doba přežívání parazita v RH je dostatečně dlouhá natolik, aby došlo k vývoji do infekčních stádií parazita a infekci vektorů (toto kritérium musí být vždy splněno).

Ashford (1996) uvádí, že RH musí být v oblasti hojný, dále musí tvořit velkou část biomasy na daném území (častý je život v koloniích či skupinách), měl by být relativně dlouhověký, aby zajistil přetrvání infekce v období, kdy k přenosu nedochází. Zároveň parazit není zpravidla pro RH výrazně patogenní a nezpůsobuje mu akutní onemocnění.

Mnoho druhů obratlovců může být po sání infikovaných flebotomů nakaženo a může dojít i k vytvoření léze, které jsou dále infekční pro flebotomy. Z těchto jedinců lze pak získávat izoláty, ale neznamena to, že druh, z kterého je izolát získán je zároveň rezervoárem. Často je jen náhodným hostitelem a význam v koloběhu a přenosu infekce je ve většině případů neznámý. Jako RH některého druhu *Leishmania* sp. je známo a opravdu potvrzeno jen poměrně málo druhů živočichů a některé druhy savců mohou sloužit jako rezervoár pro více druhů leishmanií (Ashford, 1996). Potvrzení nějakého druhu jako RH je složité a vyžaduje jak terénní, tak laboratorní výzkum, aby mohla být vytvořena komplexní síť důkazů, která objasní všechny články podílející se na životním cyklu leishmanií v dané oblasti (shrnutí v Roque, Jansen, 2014). Například Reithinger a Davies (1999) shrnují, že bylo publikováno více než 90 studií o psech nakažených kožní leishmaniózou v Jižní Americe, ale neexistují téměř žádná data o tom, zda tyto psi byli infekční pro flebotomy nebo zda mají epidemiologický význam v přenosu a jsou rizikem pro další hostitele. Někteří nakažení hostitelé vykazují jen sérologickou pozitivitu bez přímého nálezu parazita, což vypovídá o tom, že se setkali s leishmaniovou infekcí, ale nutně to neznamena, že hrají nějakou důležitou roli v přenosu onemocnění (Roque, Jansen, 2014).

Hlavní ohniska zoonotické leishmaniózy jsou v Africe, Asii a mnoha zemích Jižní Ameriky. V endemických zemích Starého světa jsou hlavními původci zoonotické leishmaniózy *L. major*, *L. aethiopica* a *L. donovani infantum*. V tabulce 1 jsou vypsány konkrétní druhy savců, u kterých byla v přírodě nalezena infekce těmito leishmaniemi Starého světa.

Nákazy *L. tropica* jsou obecně uváděny jako antroponózy, ale v některých oblastech mohou hrát roli damani (Svobodová *et al.*, 2006), hlodavci (Svobodová *et al.*, 2003; Kassahun *et al.*, 2015), psi (Yaghoobi – Ershadi *et al.*, 2000) a jiné psovitě šelmy (Talmi – Frank *et al.*, 2010), netopýři (Kassahun *et al.*, 2015). Stejně tak *L. donovani donovani* (blízce příbuzná *L. donovani infantum*, která je zoonózou) byla detekována v několika druzích zvířat v endemických oblastech severní, severozápadní a jihozápadní Etiopie, v Súdánu, v Keni (Ashford, 2000; Hailu *et al.*, 2006). Ve východní Africe byly v 60. letech izolovány leishmanie z několika druhů zvířat, například z *A. niloticus* a později byly izoláty identifikovány jako *L. donovani* (Ashford, 2000). Studie Kassahun *et al.* (2015) uvádí nálezy infekcí *L. donovani* u divokých druhů hlodavců v Etiopii, mimo jiné u hlodavců rodu *Arvicanthis*.

V Novém světě byly leishmaniové infekce zaznamenány u hostitelů z řádů: Didelphimorphia (vačice), Pilosa (lenochodi, mravenečníci), Cingulata (pásovci), Rodentia (hlodavci), Carnivora (šelmy), Primates (primáti), Chiroptera (letouni), Perissodactyla

(lichokopytníci) (Ashford, 1996; Roque, Jansen, 2014).

Jsou známy i druhy *Leishmania* sp., které byly nalezeny u zvířecích hostitelů, ale ne u člověka. Například druhy: *L. gerbilli*, *L. turanica*, *L. arabica* u hlodavců Starého světa (Ashford, 2000) nebo *L. equatoriensis* u stromových savců v Ekvádoru (Grimaldi *et al.*, 1992) a *L. macropodum* u klokanů *Macropus rufus* (Rose *et al.*, 2004).

druh <i>Leishmania</i> sp.	řád	druh
<i>L. major</i>	Rodentia (hlodavci)	<i>Xerus rutilus</i> (veverka šilu)
		<i>Gerbillus pyramidum</i> (pískomil egyptský), <i>Gerbillus</i> sp.
		<i>Tatera gambiana</i> (pískomil štětkoocasý)
		<i>Tatera indica</i> (pískomil indický)
		<i>Tatera robusta</i> (pískomil větší)
		<i>Taterillus emini</i> (pískomil malý)
		<i>Meriones crassus</i> (pískomil hedvábný)
		<i>Meriones hurrinae</i> (pískomil pouštní)
		<i>Meriones libycus</i> (pískomil rudoocasý)
		<i>Meriones shawi</i> (pískomil Shawův)
		<i>Psammomys obesus</i> (pískomil tlustý)
		<i>Rhombomys opimus</i> (pískomil velký)
		<i>Arvicanthis niloticus</i> (myš nilská), <i>Arvicanthis</i> sp.
		<i>Mastomys erythroleucus</i> (myš guinejská)
		<i>Mastomys natalensis</i> (myš mnohobradavková)
		<i>Aethomys kaiseri</i> (krysa Kaiserova)
		<i>Nesokia indica</i> (krysa morová)
	Erinaceomorpha (hmyzožravci)	<i>Atelerix algirus</i> (ježek alžírský)
		<i>Paraechinus aethiopicus</i> (ježek pustinný)
	Carnivora (šelmy)	<i>Felis silvestris</i> (kočka domácí)
	Primates (primáti)	<i>Cercopithecus aethiops</i> (kočkodan obecný)
<i>L. donovani infantum</i>	Rodentia (hlodavci)	<i>Rattus rattus</i> (krysa obecná)
		<i>Rattus norvegicus</i> (potkan obecný)
		<i>Mus musculus</i> (myš domácí)
		<i>Mus spretus</i> (myš středozevní)
		<i>Apodemus sylvaticus</i> (myšice křovinná)
		<i>Mesocricetus auratus</i> (křeček zlatý)
		<i>Cricetulus migratorius</i> (křečík šedý)
		<i>Meriones persicus</i> (pískomil perský)
	Lagomorpha (zajícovci)	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (králík divoký)
		<i>Lepus granatensis</i> (zajíc iberský)
	Carnivora (šelmy)	<i>Canis familiaris</i> (pes domácí), <i>Canis</i> sp.
		<i>Vulpes vulpes</i> (liška obecná), <i>Vulpes</i> sp.
		<i>Felis silvestris</i> (kočka domácí)
		<i>Martes martes</i> (kuna lesní)
		<i>Mustela nivalis</i> (lasice kolčava)
		<i>Meles meles</i> (jezevec lesní)
		<i>Genetta genetta</i> (ženetka tečkovaná)
		<i>Nyctereutes procyonoides</i> (psík mývalovitý)
		<i>Lynx pardinus</i> (rys iberský)
		<i>Herpestes ichneumon</i> (promyka ichneumon)
<i>L. aethiopica</i>	Rodentia (hlodavci)	<i>Cricetomys gambianus</i> (krysa obrovská)
	Hyracoidea (damani)	<i>Heterohyrax brucei</i> (daman stepní)
		<i>Procavia capensis</i> (daman skalní)
		<i>Dendrohyrax arboreus</i> (daman stromový)

Tabulka 1: Přehled potencionálních savčích hostitelů zoonotických druhů leishmanií Starého světa

(sestaveno z Ashford, 1996; 2000; Grammicia, Gradoni, 2005; 2007; Quinnell, Courtenay, 2009; Ruiz – Fons *et al.*, 2013 Díaz - Sáez *et al.*, 2014; Tomás – Pérez *et al.*, 2014; Pasa *et al.*, 2015)

2.2.1 Role hlodavců jako rezervoárů infekce *L. major*

L. major je široce rozšířený parazit pouštních a savanových hlodavců Starého světa a člověk je jen jeho náhodným hostitelem, u kterého způsobuje kožní leishmaniózu (Schlein, Jacobson, 1996). Přenos z člověka na člověka je velmi nepravděpodobný a rezervoárový hostitel je vždy přítomen (Ashford, Bettini, 1987). Tento fakt podporují i některé experimentální studie. Schlein a Jacobson (1996) srovnávali vývoj infekce *L. major* ve flebotomech nasátých na krvi různých hostitelů – člověka, králíka a *Ps. obesus* (pískomil tlustý); rezervoárového hostitele *L. major* v přírodě. Lidská krev měla na infekci výrazně inhibiční efekt oproti krvi *Ps. obesus*. Infekce u experimentálně nakažených flebotomů lidskou krví s promastigoty leishmanií byla 48 % a silná infekce se vyvinula jen u 6,6 % flebotomů. Oproti tomu ve skupině nakažených z krve *Ps. obesus* se infikovalo 76,9 % flebotomů a silná infekce se vyvinula u 58,5 %. Přenosu leishmanií na dalšího hostitele jsou schopni především flebotomové se silnou infekcí. Dále stejní autoři uvádějí, že u infekce flebotomů získané z člověka, je 10 x menší pravděpodobnost přenosu, než pokud je infekce získána z hlodavčího rezervoárového hostitele.

Hlodavci představují velkou část biomasy v endemických oblastech a mají tak potenciál být rezervoárovými hostiteli leishmanií (Navea – Pérez *et al.*, 2015). Hlodavci aridních a savanových oblastí Starého světa často žijí v norách, které pro flebotomy představují hlavní místo k odpočinku a vývoji larev a hlodavci jsou pro ně oblíbeným zdrojem krve (Abai *et al.*, 2010). Nory hlodavců jsou vhodné pro vývoj flebotomů, protože je v nich konstantní teplota, vlhkost a organický odpad, kterým se živí larvy flebotomů (Ashford, 1996).

V endemických oblastech jsou hlavními rezervoárovými hostiteli CL působené *L. major* hlodavci z podčeledi Gerbillinae (pískomilové). Jsou to především druhy *Rhombomys opimus* ve Střední Asii, severním Afganistánu a Iránu, *Meriones hurrianae* v Indii a Iránu, *Psammomys obesus* a *Meriones crassus* v severní Africe a na Středním východě, *Meriones libicus* na Arabském poloostrově a ve Střední Asii (shrnutí v Grammicia, Gradoni, 2005; Akhavan *et al.*, 2010b). V subsaharské Africe by za RH mohlo být považováno několik rodů hlodavců – *Arvicanthis* sp. (Muridae, Murinae), *Mastomys* sp. (Muridae, Murinae), *Tatera* sp. (Muridae, Gerbillinae), *Xerus* sp. (Sciuridae, Xerinae). *L. major* byla v této oblasti izolována z druhů: *Tatera robusta*, *T. gambiana*, *Arvicanthis niloticus*, *Mastomys natalensis*, *M. erythroleucus*, *Taterillus emini* (Muridae, Gerbillinae), *Aethomys kaiseri* (Muridae, Murinae) (Heisch *et al.*, 1959; Dedet *et al.*, 1979; Githure *et al.*, 1986). Nejvíce izolátů bylo získáno z druhu *Arvicanthis* sp., nejčastěji

uváděn *A. niloticus*, ale taxonomie tohoto rodu je poměrně nejasná. Ashford (1996) upozorňuje, že při výzkumu je často druh, z něhož je izolát získán, zařazen pouze do rodu nebo čeledi a doporučuje, aby se na výzkumu rezervoárových hostitelů podílel i zkušený zoolog, který dokáže živočichy detailněji určit. Populace hlodavců rodu *Arvicanthis* vykazuje enormní výkyvy ve velikosti a v období nízké abundance by v koloběhu *L. major* mohly hrát roli hlodavci rodu *Mastomys* (Ashford, 1996).

Jedním z dobře popsanych, stabilních zoonotických systémů je *L. major* – *R. opimus* - *P. papatasi* ve Střední Asii, Afganistánu a Iránu (Grammicia, Gradoni, 2005). *R. opimus* je druh píscomila, který žije v organizovaných společenstvích, vytváří rozsáhlé systémy podzemních nor, které jsou optimální pro vývoj flebotomů žijících s hlodavci v úzkém kontaktu. Je to druh dlouhověký (2,5 – 3 roky), odolný a hojný (Dubrovsky, 1975). Leishmanie mohou být v jedincích tohoto druhu v různých tkáních prakticky celý jejich život bez ztráty virulence a dostupnosti pro flebotomy. Zejména jsou infikovány uši, které jsou pro flebotomy dobře dostupné. Jako denní druh se orientuje zrakem a má proto menší a tlustší uši než druhy noční, které se řídí sluchem a mají uši větší a tenčí (Abai *et al.*, 2010). Yaghoobi – Ershadi a Javadian (1996) zaznamenali prevalenci leishmanií v populaci *R. opimus* ve sledovaném období až 90,5 % a odchycení jedinci měli infekci v jednom nebo v obou uších.

2.3 Biologie hlodavců rodu *Arvicanthis*

Rod *Arvicanthis* Lesson, 1842 patří do řádu hlodavci (Rodentia), čeledi myšovití (Muridae), podčeledi pravé myši (Murinae). Je velký 9 – 21 cm a ocas dosahuje délky 22 – 32 cm. Obývá africké savany a stepi jižně od Sahary a údolí řeky Nil až k oblasti Středozemního moře. Tento rod představuje velkou část africké savčí fauny a je často popisován jako dominantní hlodavec savan a stepí subsaharské Afriky (Volobouev *et al.*, 2002). Hlodavci tohoto rodu vytvářejí kolonie, které obývají podzemní nory. Vchody do nor se často nacházejí pod kmeny stromů, keřů, skal, termitišť a pod povrchy různých staveb. Typická je stavba únikových cest, které rozšiřují noru do různých tvarů, jsou pečlivě udržovány a čištěny od kořínků rostlin a jiných překážek a slouží k rychlému úniku před predátory. Hlodavci rodu *Arvicanthis* mají denní aktivitu v přírodě i v lidské péči. Jsou primárně herbivorní, konzumují traviny, různé jiné rostliny, semena a zemědělské plodiny (St. John, 2005). V Etiopii jsou spolu s hlodavci rodu *Mastomys* považováni za nejvíce rozšířené škůdce na úrodě (Bekele *et al.*,

2003). V norách žijí společně obě pohlaví. Packer (1983) studoval kolonie *A. niloticus* v Tanzánii a uvádí průměrný poměr pohlaví 2,6 samic na 3,1 samců v jedné kolonii. Pozorovány byly však i kolonie s jedinci pouze samčího nebo samičího pohlaví. Rozmnožování probíhá hlavně v období dešťů, protože v období sucha mají inhibiční efekt na reprodukční orgány vysoké teploty, dlouhé dny a omezené zdroje potravy a vody. Samice jsou gravidní průměrně 23 dní a rodí 4 – 12 mláďat, průměrně pět (údaj pro *A. niloticus*). Massawe *et al.* (2007) sledoval druh *A. neumanni* ve střední Tanzánii a udává 4 – 11 nebo 1 – 9 mláďat ve vrhu v závislosti na lokalitě. Průměrná doba laktace samic je 21 dní. Bylo pozorováno, že z kolonie pak častěji odcházejí samci a to ve věku okolo 9 – 11 měsíců. Mláďata pohlavně dospívají ve věku 3 – 4 měsíců. Pohlavně dospělý samec má viditelně sestouplá varlata (Massawe *et al.*, 2007). Průměrná doba života v lidské péči je 2 a více let (St. John, 2005). Doba života ve volné přírodě není příliš známá, ale Packer (1983) uvádí průměrné dožití mezi 10,2 až 20 měsíci.

Volobouev *et al.* (2002) uvádí, že navzdory tomu, že je *Arvicanthis* velmi hojný a důležitý z hlediska významu v koloběhu různých infekčních onemocnění, tak je jeho taxonomie velmi nejasná, včetně geografického rozšíření jednotlivých druhů. Mnoho autorů problematicky označuje všechny odchycené jedince jako *A. niloticus* (Bekele *et al.*, 1993). Momentálně jsou uznávány tyto druhy: *A. abyssinicus*, *A. blicki*, *A. nairobae*, *A. neumanni* (Příloha 1), *A. niloticus* (Příloha 2), *A. somalicus* (Musser a Carleton, 2006; Castiglia *et al.*, 2006). V Etiopii, kde je pravděpodobně evoluční centrum rodu *Arvicanthis* (Kingdon, 2005) je uváděn jako nejhojnější druh *A. dembeensis*, *A. niloticus*, *A. abyssinicus* (Workeneh *et al.*, 2011; Meheretu *et al.*, 2014). Na západě Afriky je jako typickým druhem savan Senegalu uváděn *A. niloticus*, vykazující velkou abundanci na začátku období dešťů. Společně zde koexistují s pískomily a jinými myšovitými hlodavci (nejčastěji rodu *Mastomys*), a vytvářejí na druhy bohaté společenství (Bâ *et al.*, 2012).

A. niloticus je považován za hostitele *Schistosoma mansoni* (Duplantier, Sene, 2000), blech *Xenopsylla cheopis* přenášejících bakterie *Yersinia pestis*, původce moru (Panagiotakopulu, 2004), patogenního viru rýže (Rice yellow mottle virus) (Sarraf, Petters, 2003). V Súdánu je *A. niloticus* považován za rezervoár *L. major* (El – Hassan, Zijlstra, 2001) a je o něm uvažováno i jako možný rezervoár *L. donovani donovani* ve východní Africe (Ashford, 1996). Ashford (2000) uvádí hlodavce rodu *Arvicanthis* jako možné rezervoáry *L. major* v endemických oblastech subsaharské Afriky.

Druh používaný pro tuto práci je *A. neumanni* Matschie, 1894. Tento druh se ještě dělí na minimálně dva poddruhy a obývá území od Etiopie a Somálska, Keňu po Tanzánii, kde

nevystupuje nad 1000 metrů nad mořem (IUCN, 2016). Tento druh je velmi hojný v oblasti střední Tanzánie společně s druhem *M. natalensis* (Massawe *et al.*, 2007).

2.4 Preference rezervoárových hostitelů krevsajícími vektory a vliv krve hostitelů na fekunditu vektorů

Hematofágní hmyz často preferuje určité skupiny hostitelů, což má vliv na koloběh vektory přenášených chorob (Lehane, 2005). Znalost hostitelské preference vektorů je proto nezbytná pro porozumění koloběhu onemocnění a sledování role jednotlivých druhů flebotomů v epidemiologii leishmaniózy (Yaghoobi – Ershadi *et al.*, 1995). Výběr hostitele je ovlivněno mnoha faktory – od obranného chování a imunitní odpovědi hostitele, přes další fyziologické, morfologické, ekologické, geografické faktory, po momentální rozhodnutí daného jedince. Vliv na výběr hostitele mají i sezónní změny ve velikosti populací, kdy při dostatečném množství preferovaných hostitelů dochází k minimálnímu sání na jiných hostitelích (Lehane, 2005). V neposlední řadě je důležité, že vliv na výběr hostitele má učení a paměť hematofágního hmyzu. Vektoři si vybírají hostitele i na základě předchozí zkušenosti s hostitelem, na kterém již úspěšně sáli, což podporuje adaptaci parazitů (Vinauger *et al.*, 2016).

Krev různých hostitelů se liší svými vlastnostmi včetně kalorické hodnoty, množství proteinů (např. isoleucinu) a jiných faktorů, které mají vliv na fekunditu vektorů. Také časová a energetická náročnost potřebná ke zpracování krve různých hostitelů se liší a je to další faktor, který může vést k preferenci určitého hostitele. Krvinky jsou v zažívacím traktu krevsajícího hmyzu rozrušovány mechanicky a enzymaticky. Mechanický rozpad krvinek je například u komárů zajišťován kutikulární armaturou cibária a rozdíly v této armatuře (počet a morfologie řad kutikulárních zubů) korelují s relativním rozsahem hemolýzy. Protože mechanická hemolýza je méně časově a energeticky náročná než enzymatická, komáři mohou být selektováni na sání na takovém hostiteli, jehož krvinky jsou nejlépe rozrušeny daným typem cibariální armatury. Tyto odlišnosti ve fyzikálních, chemických a jiných vlastnostech krve hostitelů mají vliv na reprodukci a mohou vést k preferenci sání na optimálním hostitelském druhu (Colluzi *et al.*, 1982; shrnuto v Lyimo a Ferguson, 2009).

Výběr hostitele v případě flebotomů ovlivňuje i fakt, že nejsou dobrými letci. Drží se proto v blízkosti svých hostitelů a jsou často nalézáni přímo v jejich habitatech, typicky v norách zvířat (Mutinga *et al.*, 1990). *P. duboscqi*, hlavní přenašeč kutánní leishmaniózy

v subsaharské Africe byl například jedním z druhů nejčastěji zachycených v okolí nor hlodavců v Keni (Basimike *et al.*, 1992; Ngumbi *et al.*, 1998). Dedet *et al.* (1980) považuje hlodavčí nory za hlavní místo vývoje *P. duboscqi* v Senegalu. Valenta *et al.* (2000) uvádí hlodavčí nory jako nejčastější habitat *P. duboscqi* v Afrotropické oblasti.

Mezi flebotomy jsou druhy sající preferenčně na užším okruhu hostitelů i druhy oportunistické. *Lu. longipalpis*, *P. papatasi* a další druhy flebotomů, kteří jsou oportunističtí a vykazují jak antropofilní, tak zoofilní chování, představují také největší riziko v přenosu leishmaniózy. Harre *et al.* (2001) porovnával úspěšnost reprodukce u *P. papatasi* po nasátí krve osmi různých hostitelů přes kuřecí membránu a nepozoroval významné rozdíly v mortalitě ani fekunditě samic nasátých na lidské krvi v porovnání s krví různých zvířat. Ve studii Macedo – Silva *et al.* (2014) byl studován vliv krve z různých hostitelů na vývojový cyklus a fekunditu flebotomů druhu *Lu. longipalpis* (vektor *L. infantum* v Jižní Americe). Pro experimenty byly využívána anestetizovaná zvířata (dva druhy morčat, kůň, dva druhy vačic, kosman, kočka, pes, kur, křeček) a krev z člověka. Flebotomové ochotně sáli na všech druzích kromě kočky, ale samice, které sály na vačici *Monodelphis domestica*, nevykládly žádná vajíčka. Po nasátí na ostatních druzích se flebotomové dále dobře vyvíjeli, především po nasátí na krvi lidské a krvi morčat, koně, psa a kura, ale lišili se v počtu vykladených vajec a v počtu dní vývoje od vajíčka do dospělce. Flebotomové nasátí na psovi, který je obecně uznáván společně s jinými psovitými šelmami jako rezervoárový hostitel *L. infantum*, neměli největší počet vykladených vajec a ani nejkratší životní cyklus.

Výběr hostitele, mortalitu po sání a fekunditu v laboratorních podmínkách testovala Sádlová *et al.* (2003) u druhu *P. halapensis*. V preferenčních pokusech byl porovnáván člověk, krysa obecná (*Rattus rattus*) a králík (*Oryctolagus cuniculus*). Člověk byl preferován před králíkem i krysou a výběr hostitele neměl výrazný efekt na mortalitu po sání ani na fekunditu flebotomů.

V laboratorních podmínkách je kromě hostitelské preference a fekundity sledován i například čas potřebný k plnému nasátí samic flebotomů. Chagas *et al.* (2007) takto testovali kolonii jihoamerického druhu *Lu. cruzi*, což je jeden z druhů přenášející VL v Brazílii. Chagas *et al.* (2007) ve studii sledovali i míru nasátí samic, protože míra nasátí ovlivňuje, kolik oocytů dozraje a následně kolik je samicí vykládáno vajíček (fekundita) (Ready, 1979).

V přírodních podmínkách je jednou z cest, jak mapovat, zda je nějaký zdroj krve preferován, identifikace zdrojů krve z odchycených samic flebotomů pomocí molekulárních

nebo sérologických metod. Preferované zdroje mohou poskytnout informace o možných rezervoárových hostitelích nebo oblíbených zdrojích krve (Haouas *et al.*, 2007; Abassi *et al.*, 2009, Burniston *et al.*, 2010).

Časté jsou i experimentální preferenční terénní studie. U jihoamerického druhu *Lu. whitmani*, hlavního přenašeče kutánní leishmaniózy v Brazílii, testovali antropofilní chování Cambell – Lendrum *et al.* (1999) a uvádějí výraznou preferenci člověka jako hostitele oproti jiným druhům. Mutinga *et al.* (1986) testoval hostitelskou preferenci šesti druhů zvířat pro různé druhy flebotomů v Keni pomocí pastí, ve kterých byla tato zvířata umístěna. Jedním z druhů vyskytující se v této oblasti (Marigat, Keňa) je *P. duboscqi*, který je zde považován za vektora *L. major* (Mutinga a Kaddu, 1983). *P. duboscqi* nejvíce preferoval kura domácího, následně „divokou krysu“ (autor neuvádí druh), kozu, psa a promyku. Atraktivita „divoké krysy“ pro tento druh nasvědčuje tomu, že je zapojen v přenosu *L. major* mezi hlodavci (Mutinga *et al.*, 1986).

Hassan *et al.* (2009) porovnával hostitelskou atraktivitu možných rezervoárových hostitelů *L. donovani* pro *P. orientalis* v Súdánu. Preferenci sání přenašeče VL *P. orientalis* testoval na psovi (*Canis familiaris*), promyce ichneumon (*Herpestes ichneumon*), ženetce tečkované (*Genetta genetta*) a myši nilské (*Arvicanthis niloticus*). Výrazně nejvíce přitahoval *P. orientalis* pes, druhé preferované zvíře byla promyka, která je potencionálními rezervoár leishmanií v sylvatických cyklech východní Afriky (Elinaiem *et al.*, 2001). Myš nilská mohla být oproti ostatním druhům znevýhodněna velikostí těla, protože mnohem větší zvířata přilákají více flebotomů. Hassan *et al.* (2009) ovšem uvádí, že když byla velikost těla zohledněna, tak se neukázala žádná korelace s množstvím flebotomů, které myš nilská přitahovala ($P = 0.074$).

Se stejným druhem přenašeče pracoval v Súdánu Quate (1964). Tato studie byla zaměřena na hostitelskou preferenci malých druhů zvířat. Mezi testovanými zvířaty byl i druh *M. natalensis ismailiae* a *A. niloticus*. Zatímco na *Mastomys* sp. se nenasál žádný ze 180 flebotomů, na *Arvicanthis* sp. sálo 14 % z celkových 57 jedinců. V dalších endemických oblastech VL (severní Etiopie) byl flebotomy druhu *P. orientalis* preferováni z domácích zvířat skot a osli oproti jiným domácím zvířatům, včetně psa. Třetím nejvíce preferovaným hostitelem byl člověk. V dalším experimentu byla sledována preference divokých druhů zvířat a nejvíce preferován byl druh *Xerus rutilus* (veverka šilu) (Gebresilassie *et al.*, 2015).

2.5 Xenodiagnostika

Xenodiagnostika je laboratorní metoda, která se využívá k detekci a izolaci patogenů z krve člověka a zvířat pomocí přirozeného přenašeče, který slouží jako biologické médium. Metoda byla vyvinuta v roce 1914 francouzským parazitologem A. J. É. Brumptem, původně k detekci *Trypanosoma cruzi* v krvi nakažených jedinců pomocí laboratorně chovaných nymf ploštic podčeledi Triatominae, vektorů Chagasovy choroby (Schenone, 1999, Guarga *et al.*, 2000).

Dnes se k detekci patogenů v krvi využívá jiných metod, především sérologických a molekulárních. Xenodiagnostika našla uplatnění především ve výzkumu, kde slouží k testování infektivy různých hostitelů pro vektory a jejich významu v epidemiologii onemocnění. Převážná většina studií je dělána na domácích psech v endemických zemích *L. infantum* (Molina *et al.*, 1994; Travi *et al.*, 2001; Courtenay *et al.*, 2002; Michalsky *et al.*, 2007) a menší část na jiných druzích zvířat, včetně člověka (shrnutí v Quinnell, Courtenay, 2009).

Použití xenodiagnostiky a testování možných rezervoárových hostitelů flebotomů v laboratorních podmínkách je závislé na úspěšném chovu flebotomů. Z několika stovek známých druhů flebotomů se podařilo kolonizovat jen některé a jen omezené množství druhů se daří chovat v dostatečném množství pro experimentální práci (Volf, Volfová, 2011).

Molina *et al.* (2012) potvrdili pomocí xenodiagnostiky infekčnost divokých zajíců *Lepus granatensis* nakažené *L. infantum* pro flebotomy *P. perniciosus* v ohnisku nákazy v jihozápadní oblasti Madridu. Jiménez *et al.* (2014) ve stejné oblasti testovala divoké králíky (*Oryctolagus cuniculus*) nakažené *L. infantum* pomocí xenodiagnostiky a potvrdili jejich roli v koloběhu onemocnění. Alexander *et al.* (1998) testoval čtyři druhy savců odchycených na kávových plantážích v Kolumbii infikovaných *L. (V.) braziliensis*. V jejich pokusech naopak žádná z 268 vyšetřovaných samic flebotomů ze stejné oblasti (*Lu. youngi*, *Lu. colombiana*) 3 – 5 dní po sání nebyla nakažena, přestože sály na PCR pozitivních jedincích.

Xenodiagnostické pokusy s křečkou (*Mesocricetus auratus*) experimentálně nakaženými *L. tropica* prováděli Hanafi *et al.* (2013). Jako vektor byl použit *P. duboscqi*. Flebotomové byli nakaženi dvěma způsoby – přes membránu a sáním na kožní lézi nakaženého křečka. Samicím flebotomů z obou skupin bylo několik dní po sání umožněno sání na naivních křečkách. U žádného z těchto pokusných zvířat se nevyvinula léze, ale *L. tropica* byla detekována pomocí qPCR ve tkáních. Ovšem pouze u jedinců, na kterých sáli flebotomové nakažení přes membránu, přestože i flebotomové sáli na kožní lézi byli infikováni. *L. tropica* byla detekována

v játrech, slezině, krvi a kostní dřeni. Na těchto pokusech je také zajímavé, že *P. duboscqi* pocházející z Keni se nakazil a přenesl infekci *L. tropica* z Turecka izolovanou z člověka.

Infektivitu křečků nakažených *L. major* pro *P. duboscqi* sledoval Lawyer *et al.* (1990). Infekce u flebotomů nasátých z nosní léze křečka byla zaznamenána u 47 %. Lawyer *et al.* (1990) také zaznamenal schopnost nakaženého *P. duboscqi* *L. major* z křečka infikovat 14 dní po sání laboratorní myš.

Sádlová *et al.* (2015) zavedla zvířecí laboratorní model pro *L. donovani*. Pomocí xenodiagnostických pokusů testovala infekčnost laboratorních myší kmene BALB/c pro flebotomy druhu *P. orientalis*. BALB/c myši nevykazují v průběhu infekce žádné známky onemocnění, přesto jsou infekční pro flebotomy. Tento model umožňuje studovat infektivitu *L. donovani* bez použití lidských pacientů nakažených tímto parazitem.

3 Materiál a metodika

3.1 Složení použitých roztoků

- Anestetikum - 2% xylazin (Rometar; Spofa) + 10% ketamin (Narketan; Vétoquinol) + sterilní fyziologický roztok (150 mM NaCl) - intraperitoneální dávkování
- Fyziologický roztok – 150 mN NaCl Braun
- Krevní agar pro kultivaci *L. major* – pevná složka Bacto Neopeptone 2 g (BD), Bacto Agar (BD) 2 g, NaCl 0,6g doplněno do 100ml H₂O, sterilizováno autoklávem 20 min, po zchlazení přidáno 25ml sterilní defibrilované králičí krve (Bioveta), tekutá složka (Overlay) stejné složení, ale bez agaru, sterilizováno autoklávem
- Navazovací roztok (karbonát – bikarbonát) - 20 mM Na₂CO₃ - NaHCO₃; pH 9,0- 9,5
- PBS - 150 mM NaCl + 3 mM KCl + 8 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O + 1 mM K₂HPO₄, pH 7,2
- Promývací roztok – PBS + 0,05% Tween
- Ředící roztok na počítání leishmanií v Bürkerově komůrce - 0,85% NaCl +1% formaldehyd (CH₂O)
- Substrátový roztok – McIlweine fosfát-citrát (pH 5,50) + 11 M Na₂HPO₄ x 12 H₂O + 0,5 M kyselina citronová, těsně před použitím přidat 5M OPD (orthofenylendiamin) a 0,03% H₂O₂
- Tekuté médium pro kultivaci *L. major* – médium M199 (Sigma) + 20% fetální bovinní sérum (Gibco, kat. č. F9665) + 1% BME vitamíny (Sigma, kat. č. B6891) + 0,8% amikin (Bristol- Myers Squibb, kat. č. 1038585A2) + 2% sterilní moč

3.2 Chov flebotomů

Flebotomové pro pokusné účely jsou chovány ve speciálních místnostech insektária. V chovech by měla být udržována konstantní teplota 24 – 28° C, což je optimum pro většinu druhů. Kolonie naší laboratoře jsou chovány v teplotě 25 – 26° C. V místnostech je udržována vysoká vlhkost – 60 – 70% pomocí elektrických zvlhčovačů vzduchu. Dospělí flebotomové jsou chováni v nylonových sítích natažených na kovových konstrukcích a celá konstrukce je vložena do igelitového pytle. V pytli je pomocí navlhčené vaty na plastovém tácku udržována optimální vlhkost mezi 70 – 90 %. Fotoperioda je nastavena na 14 hodin světla a 10 hodin tmy. Do sítě je vkládán na Petriho misku kousek vaty s 50% roztokem sacharózy, sloužící jako potrava.

Samicím flebotomů minimálně 3 – 4 dny starým je předkládán zdroj krve – nejčastěji

laboratorní myši, králíci a křečci. Kolonie *P. duboscqi* používaná pro pokusy v této diplomové práci je udržována sáním na laboratorních myších kmene BALB/c jednou až dvakrát týdně. Myším je před vložením do sítě k flebotomům intraperitoneálně aplikováno anestetikum (ketamin s xylazinem), protože na anestetizovaném zvířeti flebotomové lépe sají. Samice při sání preferují tmou – ta je zajištěna překrytím sítě tmavou látkou nebo snížením osvětlení v místnosti.

Nasáté samice se po defekaci přemístí do kelímků, jejichž stěny jsou pokryty tenkou vrstvou sádky a seshora kryty nylonovou tkaninou a víčkem s dírou. V kelímcích dochází ke kladení vajec, obvykle 6 – 10 dní po nasátí. *P. duboscqi* klade obvykle vejce okolo 9. dne po sání. Kelímky se samicemi jsou umístěny do větších plastových beden s víkem a se sterilizovaným vlhkým pískem na dně, který je pravidelně zvlhčován. Samice po nakladení vajec umírají a je třeba je z kelímků pomocí pinzety odstranit. Larvy jsou krmeny speciálním krmivem z fermentovaných králíčích exkrementů a krmných pelet. Vývoj probíhá přes čtyři larvální instary a kuklu. Obvyklá doba vývoje v dospělce trvá okolo tří týdnů. Dospělci vylétující z kelímků jsou pravidelně vypouštěni do nylonových sítí na kovových konstrukcích o velikosti 40 x 40 cm nebo 50 x 50 cm.

Kolonie *P. duboscqi* používaná pro tuto diplomovou práci pochází ze Senegalu a byla kolonizována v roce 1994 (Volf, Volfova, 1991).

3.3 Experimentální infekce flebotomů

Pro pokusy byl použit tři izoláty druhu *L. major*

- MHOM/IL/80/Friedlin/VI; FVI
- MARV/SN/??/LV 109
- MHOM/SN/??/LV110

Jako přirozený přenašeč *L. major* v subsaharské Africe byl vybrán druh *P. duboscqi* (Killick – Kendrick, 1990).

3.3.1 Kultivace leishmanií

Kultury se uchovávají v kryobance v tekutém dusíku v zamrazovacích ampulích CryoTube™ Vials (NUNC) v médiu obsahující 5–10 % kryokonzervační látky DMSO (Sigma-Aldrich). Týden před použitím se leishmanie vymrazí a přenesou do tekutého média pro kultivaci *Leishmania* sp., do plochých kultivačních zkušev. Kultivace probíhá při 23°C. Po pěti

dnech je kultura přeočkována do nového média.

Promastigoti používaní pro experimentální infekce flebotomů musí být v exponenciální fázi růstu (log fáze).

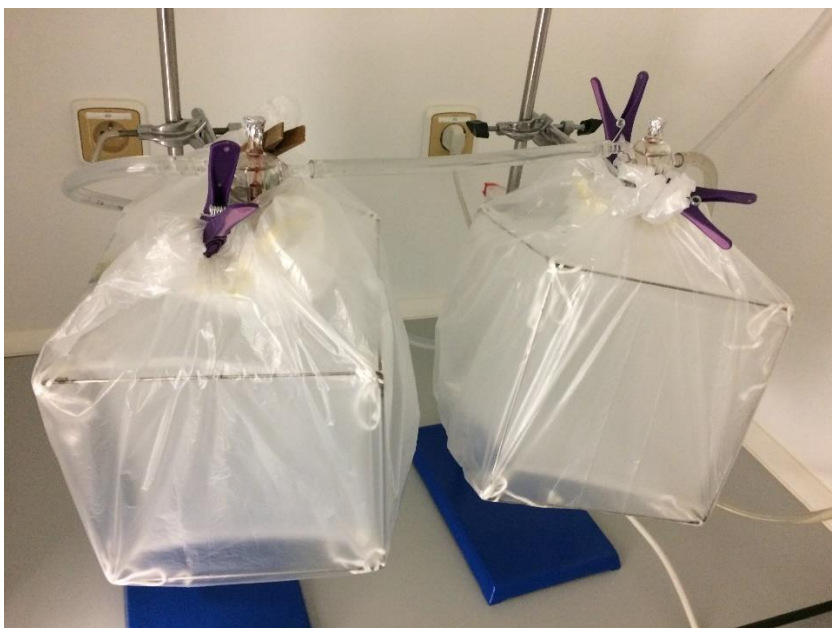
3.3.2 Infekční sání flebotomů

Infekční sání flebotomů probíhá na speciálních skleněných krmítkách přes membránu z kuřecích kůžiček. Kuřecí kůžičky jsou získávány z 1 – 3 starých usmrčených kuřat. Před použitím kůžičky na krmítko je třeba kuře zbavit peří, kůži odstříhat z hřbetní a břišní strany a 2x propláchnout v Petriho misce 70% ethanolem a sterilním fyziologickým roztokem. Následně zamrazit v – 20°C. Membrána je po rozmrazení pevně připevněna parafilmem na krmítko, tak aby samice flebotomů sály na její vnější straně.

K infekcím je používána čtyři dny stará kultura promastigotů *L. major* v log fázi růstu, která je smíchána s defibrilovanou králíčí krví. Krev je před použitím potřeba tepelně inaktivovat ve vodní lázni ohřáté na 56°C po dobu 35 minut. Požadovaná koncentrace leishmanií v 1 ml krve je 10^6 promastigotů, což je spočítáno pomocí Burkerovy komůrky.

Známy počet samic flebotomů je z kolonie přemístěno do menších nylonových sítěk o velikosti 20 x 20 cm natažených na kovové konstrukci a vložených do menších igelitových sáčků. Krmítka naplněná krví s promastigoty jsou připevněna do držáků a napojena na vodní lázeň s vnější cirkulací s teplotou vody 37°C. Ke krmítkům jsou následně připevněny sítky s flebotomy pomocí gumiček a kolíčků (Obrázek 4). Samice sají 1 – 2 hodiny v přítomnosti a teplotě 26°C. Po ukončení infekčního sání se pomocí exhaustoru odstraní nenasáté samice a do sítěk jsou umístěny mističky s kouskem vaty namočeném v 50% sacharóze. Pro zachování optimální vlhkosti uvnitř igelitového sáčku je dovnitř vložena na Petriho misku vata navlhčená destilovanou vodou. Sítky s infekčními flebotomy se umístí do termoboxů s teplotou 26°C. Do dne pitvy flebotomů je hlídána vlhkost uvnitř igelitových sáčků a třikrát týdně vyměňována vata napuštěná 50% roztokem sacharózy.

Tato metoda umožňuje infikovat flebotomy se znalostí přesné koncentrace leishmanií v krvi a poskytuje vysoké procento nakažených flebotomů – obvykle přes 90 % (Volf, Volfova, 2011).



Obrázek 4: Infekční sání flebotomů

3.3.3 Příprava slinných žláz

Pro pitvy slinných žláz jsou vhodné minimálně tři dny staré samice, protože takto staré samice již mají kompletně vytvořený proteinový profil slin (Volf *et al.*, 2000). Slinné žlázy jsou přidávány k infekční dávce leishmanií používané k nákaze hlodavců. U naivních hostitelů koinokulace slin flebotomů podporuje rozvoj leishmaniové infekce (Titus, Ribeiro, 1988; Volf, Rohousova, 2006).

Samice se pomocí exhaustoru dají do kelímku s víčkem a kelímek je ponechán na ledu, aby došlo k imobilizaci samic. Pitva probíhá pod binokulární lupou. Pomocí pinzety a špejle se zapíchnutou minucí je v kapce fyziologického roztoku na podložním skle oddělena hlava flebotoma od těla. Při správném oddělení jsou za hlavou vidět párové slinné žlázy, které se špejlí s mírně zahnutou minucí oddělí od hlavy a přenesou do mikrozkušavky s fyziologickým roztokem. Do mikrozkušavky se slinné žlázy dávají v poměru 1 slinná žláza k 1 μ l fyziologického roztoku. Slinné žlázy lze skladovat v -20°C . Před použitím k inokulaci je potřeba žlázy třikrát zmrazit v tekutém dusíku, aby došlo k jejich homogenizaci.

3.3.4 Pitvy střev infikovaných flebotomů

Samice experimentálně nakažené flebotomů se s rozvinutou zralou infekcí leishmanií se pitvají mezi 7. a 10. dnem po sání. Samice jsou ze sítěk pomocí exhaustoru přesunuty do kelímku s víčkem, který je ponořený v ledové tříšti. Tímto způsobem jsou samice imobilizovány.

Pitva probíhá pod binokulární lupou pomocí pinzety a špejle, v které je zapíchnuta minucie do tvaru L. V kapce fyziologického roztoku na podložním skle je nejdříve oddělena hlava od těla a poté ze zadní části těla vytaženo střevo. Pro vytvoření infekční dávky pro hlodavce je ze střeva používána jen thorakální část mesenteronu (dochází zde k akumulaci metacyklických promastigotů), která je pomocí špejle s minucí přenášena do mikrozkušavek s fyziologickým roztokem.

3.4 Chov *Arvicanthis neumanni*

Chovná zvířata *A. neumanni* Matschie, 1894 byla získána z pražské zoologické zahrady. Hlodavci jsou chováni v prostorách určených pro chov laboratorních myši a křečků na katedře parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Pro chov jsou používány nádoby T3 a T4 (Velaz). Podestýlku tvoří bezprašné piliny ve vrstvě přibližně 5 centimetrů. Pro obohacení prostředí v chovné nádobě slouží dřevěný domek, dřevitá vlna a ruličky z papíru. Krmná dávka je tvořena lučním senem, které je zkrmováno ad libitum a jednou denně podávanou dávkou standardní krmné směsi pro laboratorní morčata a králíky bez antikokcidika (Biopharm). Dlouhodobé zkrmování standardní krmné směsi pro laboratorní myši a potkany (ST – 1, Velaz) se neosvědčilo z důvodu nadměrného tučnění zvířat. Pro zpestření krmné dávky je jedenkrát týdně podávána nakrájená zelenina (mrkev, petržel, salát) nebo ovoce (jablko). Voda je podávána neomezeně pomocí napáječky. V chovné místnosti se udržuje konstantní teplota 20 - 24 °C a vlhkost 45 - 50 %.

Chovné skupiny tvoří jeden samec a samice. Vrhly jsou o velikosti 1 – 6 kusů. Odstav mláďat probíhá nejdříve 31 dní po narození. Odstavená mláďata stejného pohlaví jsou obvykle chována v počtech od 3 – 8 kusů dle velikosti chovné nádoby.

Při chovu i pokusech s hlodavci jsou dodržovány podmínky stanovené platnými legislativními předpisy – zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání; vyhláška č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat. Chovná místnost má přidělenou akreditaci Ministerstvem zemědělství (č. j.: 13060/2014-MZE-17214, s platností do 3. 3. 2019). Chov *Arvicanthis* sp. a pokusy na nich byly schváleny Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy rozhodnutím č. MŠMT-10270/2015-5. Se zvířaty manipulují jen lidé s platným Osvědčením o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů - Kateřina Hrnčířová

3.5 Experimentální infekce hlodavců

Experimentální infekci hlodavců předchází infekční sání flebotomů druhu *P. duboscqi* a z experimentálně nakažených flebotomů jsou pak získávána infikovaná střeva *L. major*. Tato metoda byla využita, protože simuluje reálnou situaci v přírodě a zároveň, umožňuje kontrolovat infekční dávku leishmanií a místo vpichu (Sádlová *et al.*, 2015). Jedna z pokusných skupin byla nainfikována přímo promastigoty z kultury s přidáním slinných žláz do infekční dávky.

Infekční dávka pro jedno zvíře (*A. neumanni*) je složena z 0,5 slinné žlázy flebotomů a 10 kusů thorakální části střev flebotomů infikovaných *L. major*. Střeva jsou suspendována ve fyziologickém roztoku a k nim jsou těsně před inokulací přidány homogenizované slinné žlázy. Každému pokusnému zvířeti je do levého ucha aplikováno intradermálně injekcí 5 μ l homogenátu infikovaných střev a 0,5 μ l žláz.

Hlodavci jsou při experimentální infekci anestetizováni intraperitoneálním podáním ketaminu s xylazinem.

Přesný počet leishmanií v infekční dávce pro jedno pokusné zvíře je spočítáno pomocí Burkerovy komůrky a je stanoven poměr metacyklických forem v infekční dávce na základě morfologických kritérií z barvených preparátů Giemsou dle Sádlová *et al.* (2010).

3.6 Xenodiagnostické pokusy a sledování infekce *L. major*

Pro xenodiagnostické pokusy byl vybrán vektor druhu *P. duboscqi*, jako hlavní přenašeč kutánní leishmaniózy v subsaharské oblasti Afriky, zvláště v Senegalu a Etiopii (Anderson *et al.*, 2011; Berdjane – Brouk *et al.*, 2012).

Pokusné skupiny hlodavců druhu *A. neumanni* byly intradermálně nainfikovány do levého ucha třemi různými izoláty *L. major* a poté pravidelně vystavováni sání samic flebotomů (xenodiagnostika).

V průběhu celého pokusu byla zvířata pravidelně vážena na elektrické váze (Příloha 3) a byla sledována vnější manifestace onemocnění – kožní léze.

3.6.1 Pokusná skupina *A. neumanni* s infekcí *L. major* FVI

Izolátem FVI bylo nakaženo 14 jedinců samičího pohlaví. Pokusná zvířata byla rozdělena

na dvě skupiny. Jedinci z první skupiny (6 kusů) byli v 2., 5., 10., 15., 20. týdnu PI anestetizováni, vloženi do bavlněného pytlíku, z kterého bylo vystrčeno pouze levé ucho a předloženi naivním samicím *P. duboscqi* k sání. Sání probíhalo se známým počtem samic *P. duboscqi* v malých sítkách 20 x 20 cm. Tato skupina byla experimentálně nakažena infekční dávkou pro jedno zvíře 35 000 leishmanií s 23% zastoupením metacyklických promastigotů.

Po nasátí samic byli hlodavci uloženi zpět do chovné nádoby a síťka s flebotomy uzavřena do igelitového pytlíku s navlhčenou vatou na Petriho misce. Do sítky byla vložena miska s vatou napuštěnou roztokem 50% sacharózy, sloužící jako potrava. Do dne pitvy a vyšetřování střev na přítomnost *L. major* je flebotomům poskytována stejná péče jako flebotomům v kolonii.

Pitvy střev probíhaly 7 – 11 dnů po sání. Samice byly imobilizovány v kelímku na ledu a pod binokulární lupou jim bylo na podložním sklíčku vyndáno střevo, které bylo přikryto krycím sklíčkem a vyšetřeno pod světelným mikroskopem na přítomnost *L. major*.

Ve 20. týdnu PI byla pokusná zvířata usmrcena (předávkováním anestetika a cervikální dislokací) a jejich tkáně – krev, levá uzlina, pravá uzlina, levé ucho, pravé ucho, přední packy, zadní packy, ocas, slezina, játra použity na detekci parazitů *L. major* pomocí metody qPCR.

Druhá skupina - 6 kusů nebyla předkládána flebotomům k sání, ale sloužila ke sledování infekce *L. major* v průběhu pokusu. V 10., 15., 20. týdnu PI byla vždy dvě zvířata usmrcena a jejich tkáně použity na detekci parazitů *L. major* pomocí metody qPCR. Tato skupina byla experimentálně nakažena infekční dávkou pro jedno zvíře 40 000 leishmanií s 19% poměrem metacyklických promastigotů.

Dvě pokusná zvířata sloužila jako náhradní v případě úhynů jedinců ve výše popsaných skupinách.

3.6.2 Pokusná skupina *A. neumanni* s infekcí *L. major* LV 109

Izolátem LV 109 bylo nakaženo 12 jedinců samičího pohlaví. Infekční dávka pro jedno pokusné zvíře bylo 54 000 leishmanií s 43% poměrem metacyklických promastigotů. Byly vytvořeny dvě skupiny, kde prvních 6 kusů bylo v 5., 10., 15., 20. týdnu PI anestetizováno, vloženo do bavlněného pytlíku, z kterého bylo vystrčeno pouze levé ucho a předloženo naivním samicím *P. duboscqi* k sání (oproti skupině infikované *L. major* FVI byl vynechán 2. týden PI). Pitvy střev a jejich vyšetřování na přítomnost *L. major* probíhaly obvykle 7. – 8. den po sání.

Ve 20. týdnu PI byla pokusná zvířata usmrcena (předávkováním anestetika a cervikální dislokací) a jejich tkáně – krev, levá uzlina, pravá uzlina, levé ucho, pravé ucho, přední packy,

zadní packy, ocas, slezina, játra použity na detekci parazitů *L. major* pomocí metody qPCR. Tato skupina je v dalším textu označena jako A.

Druhá skupina (skupina B) - 6 kusů nebyla předkládána flebotomům k sání, ale sloužila ke sledování infekce *L. major* v průběhu pokusu. V 10., 15., 20. týdnu PI byla vždy dvě zvířata usmrcena a jejich tkáně použity na detekci parazitů *L. major* pomocí metody qPCR.

3.6.3 Pokusná skupina A. *neumannii* s infekcí *L. major* LV 110

Izolátem LV 110 bylo nakaženo 5 jedinců samičího pohlaví. Infekční dávka pro jedno zvíře byla 36 000 leishmanií s 35% poměrem metacyklických promastigotů. Pokusná zvířata byla v 5., 10., 15., 20. PI anestetizována, vložena do bavlněného pytlíku, z kterého bylo vystrčeno pouze levé ucho a předložena naivním samicím *P. duboscqi* k sání (oproti skupině infikované *L. major* FVI byl vynechán 2. týden PI). Pitvy střev a jejich vyšetření na přítomnost *L. major* probíhaly obvykle 7. – 8. den po sání.

V 5., 10., 15., a 20. týdnu po nákaze bylo usmrceno (předávkováním anestetika a cervikální dislokací) jedno nebo dvě (20. týden) pokusné zvíře po nasátí flebotomů a jejich tkáně použity na detekci parazitů pomocí metody qPCR.

3.6.4 Pokusná skupina A. *neumannii* s infekcí *L. major* LV 109 z kultury

Infekční dávka izolátem LV 109 pro tuto skupinu, kterou tvořily 3 jedinci samičího pohlaví, byla vytvořena z promastigotů leishmanií ze stacionární fáze růstu kultury ve fyziologickém roztoku.

Každému pokusnému zvířeti se do levého ucha aplikovalo intradermálně injekcí 5 μ l fyziologického roztoku s 10^7 promastigotů z kultury a 0,5 μ l homogenátu slinných žláz *P. duboscqi*.

Pokusná zvířata byla v 5. a 15. týdnu PI anestetizována, vložena do bavlněného pytlíku, z kterého bylo vystrčeno pouze levé ucho a předložena naivním samicím *P. duboscqi* k sání. Pitvy střev flebotomů a jejich vyšetření na přítomnost *L. major* probíhaly obvykle 7. – 8. den po sání.

V 15. týdnu PI byla pokusná zvířata usmrcena (předávkováním anestetika a cervikální dislokací) a jejich tkáně – krev, levá uzlina, pravá uzlina, levé ucho, pravé ucho, přední packy, zadní packy, ocas, slezina, játra byly použity na detekci parazitů *L. major* pomocí metody qPCR.

3.7 Sledování schopnosti *L. major* dokončit životní cyklus v *A. neumanni*

Do malé sítky 20 x 20 cm s experimentálně nakaženými flebotomy druhu *P. duboscqi* byl vložen naivní hlodavec *A. neumanni*. (v anestezii). Jednotliví flebotomové byli po nasátí odchyťováni pomocí exhaustoru a přesunuti nejdříve do kelímku na ledu pro jejich imobilizaci a později do mikrozku mávek. Místo sání potencionálně infekčních flebotomů bylo zaznamenáno.

Mikrozku mávky s flebotomy byly skladovány při – 20°C a dále použity na izolaci DNA a detekci *L. major* metodou qPCR.

Po provedení qPCR bylo zjištěno, kde na těle hlodavce sáli nakažení flebotomové (uši, ocas, přední packy apod.). Tento potencionálně nakažený hlodavec byl vícekrát v různých týdnech PI předložen naivním flebotomům a ti byli následně pitváni a jejich střevo vyšetřeno na přítomnost *L. major*. Přednostně byly sání flebotomů vystavovány ty části těla zvířete, kde předtím sáli nakažení flebotomové (dle qPCR).

Na konci celého pokusu byli hlodavci usmrceni a tkáně použity na detekci parazitů pomocí metody qPCR.

Tímto způsobem byl testován celý koloběh onemocnění mezi hostitelem a vektorem.

3.8 Testování preference různých druhů hlodavců flebotomy druhu *P. duboscqi*

Pro testování hostitelské preference *P. duboscqi* byli použiti tři druhy hlodavců – laboratorní myši kmene BALB/c, *M. natalensis* a *A. neumanni*. Tyto druhy byly vybrány, protože na laboratorních myších kmene BALB/c je pravidelně sáta kolonie *P. duboscqi* a hlodavci rodu *Mastomys* jsou dalším potencionálně rezervoárovým hostitelem leishmaniózu v subsaharské Africe stejně jako *Arvicanthis* (Dedet *et al.*, 1979; Githure *et al.*, 1986).

Pokus probíhal ve třech sítkách (20 x 20 cm) natažených na kovových konstrukcích, kde prostřední síťka byla s bočními propojena pomocí papírových tunelů/ průletů o průměru 7,5 cm (Obrázek 5).

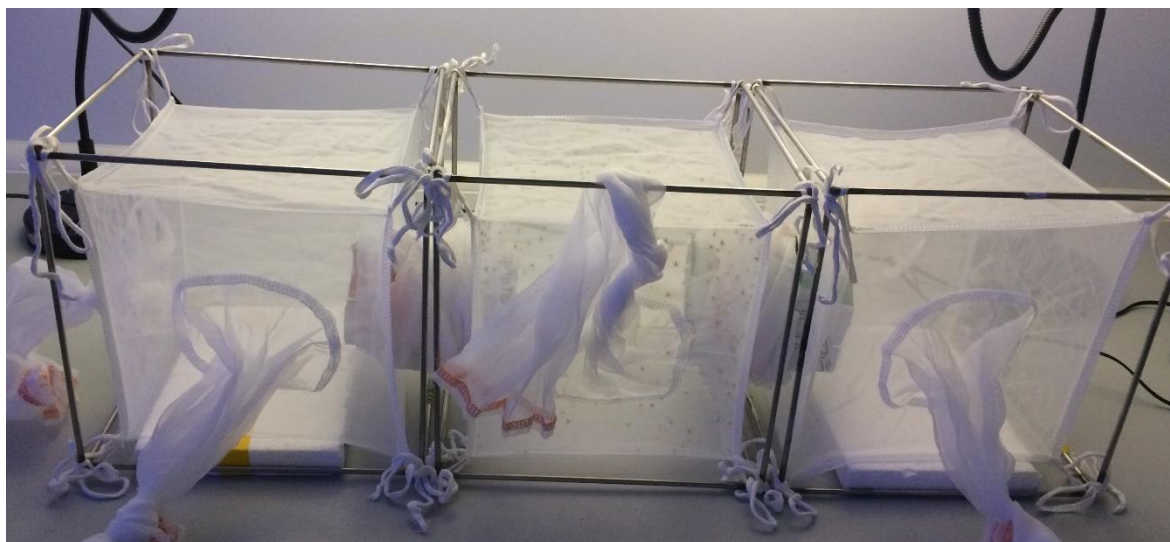
Průletové otvory byly zacpány vatou a do prostřední sítky byly dány samice flebotomů pomocí exhaustoru a do bočních sítěk byli vloženi anestezovaní hlodavci. Po dvaceti minutách, které byly samicím flebotomům ponechány k aklimatizaci na prostředí, byla vata z průletových otvorů vyndána a flebotomům bylo po dobu jedné hodiny umožněno vybrat si jednu ze stran a nasát se na vybraném hlodavci. Po nasátí byli jednotliví flebotomové odchyťováni a přesunuti

do jiné sítě a na konci pokusu spočítání.

Po skončení pokusu byli hlodavci v bočních sítkách prohozeni a pokus byl zopakován, aby nedocházelo k ovlivnění výběru flebotomů například z důvodu nižší intenzity osvětlení na jedné ze stran.

Porovnání probíhalo mezi laboratorním druhem myši kmene BALB/c a divokými druhy myšovitých hlodavců – *M. natalensis*, *A. neumanni* a vzájemně mezi těmito divokými druhy. Podle váhy jedinců divokých druhů hlodavců byly použity 1 – 2 kusy laboratorní myši kmene BALB/c, aby hostitelská preference nebyla ovlivněna velikostí pokusných zvířat. Preference sání byla také porovnávána mezi samicí a samcem *A. neumanni* stejným způsobem.

Pokus byl s každou kombinací hlodavců proveden čtyřikrát (dvakrát pro každou kombinaci strany a druhu zvířete) a probíhal v teplotě 24 – 26 °C v tlumeném osvětlení.



Obrázek 5: Testování hostitelské preference

3.9 Testování vlivu krve hostitele na mortalitu a fekunditu samic *P. duboscqi*

Pro nasátí krve flebotomy byli použiti tři druhy hlodavců – laboratorní myš kmene BALB/c, *M. natalensis*, *A. neumanni*. Po nasátí na anestetizovaném hlodavci v malé síťce byly samice následně spočítány. Dále s nimi bylo zacházeno jako s flebotomy v kolonii.

Čtvrtý den po sání byly spočítány přežívající samice a určena mortalita (%). Tyto samice byly dále individuálně umístěny v malých skleničkách, kde uvnitř byl složený filtrační papír a sklenička byla z vrchu uzavřena nylonovou tkaninou a plastovým víčkem s dírou pro přístup

vzduchu (Obrázek 6).

Tyto skleničky byly umístěny v plastové nádobě s víkem a dno bylo pokryto navlhčeným filtračním papírem destilovanou vodou. Tyto skleničky byly pravidelně kontrolovány a samice flebotomů v nich zůstaly do vykladení vajec. Samice byly podporovány v kladení zvlhčováním filtračního papíru destilovanou vodou uvnitř skleničky pomocí injekční stříkačky s tenkou jehlou. Skleničky, v kterých samice nakladly vajíčka byly spočítány a zároveň byli počítány i nakladená vajíčka.



Obrázek 6: Stanovení počtu vykladených vajec bylo umožněno individuálním umístěním samic *P. duboscqi* do skleniček s vlhkým filtračním papírem

3.10 Izolace DNA z tkání *A. neumanni* a qPCR

DNA byla izolována z tkání usmrčených pokusných zvířat v různých týdnech pokusu k detekci *L. major* pomocí metody qPCR.

Jednotlivým pokusným zvířatům byly do mikrozkušavek odebírány tyto tkáně – krev, levá uzlina, pravá uzlina, levé ucho, pravé ucho, přední packy, zadní packy, ocas, játra, slezina. Slezina a játra byly před přenesením do mikrozkušavky rozmělněny přes sítko v 500 μ l elučního pufru (Roche). Tkáně byly uchovávány při -20°C .

Izolace byla prováděna High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) dle protokolu od výrobce. DNA byla eluována do 200 μ l a uchovávána při -20°C .

Z izolované DNA byla stanovována přítomnost a množství leishmanií v jednotlivých tkáních. Metoda qPCR je založena na detekci vznikajícího amplikonu pomocí metody SYBER

Green (iQSYBER Green Supermix, Bio-Rad, Hercules, CA) na přístroji iQ5 real-time PCR detection systém (Bio-Rad). DNA kinetoplastu leishmanií byla amplifikována pomocí primerů: „forward primer“ 5'-CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG-3', „reverse primer“ 5'-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA-3'.

Metodu qPCR prováděl doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph. D.

3.11 Testování tvorby protilátek proti *L. major* metodou ELISA

Krev byla odebírána z ocasu jemně naříznutého žiletkou anestezovaných myší do krevních kapilár. Odběr probíhal v pravidelných intervalech u skupin nainfikovaných *L. major* LV 109, LV 110. Následně byla odebraná krev v kapiláře zcentrifugována a získané krevní sérum pro testování tvorby protilátek bylo uloženo do mrazáku při – 20°C.

Jako antigen byli použiti promastigoti *L. major* LV 109, LV 110 získané z kultury. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky byl nanášen antigen o objemu 100 µl a koncentraci 4×10^6 buněk/ml. Navazování antigenu na povrch jamek docházelo po dobu 2 hodin ve 37 °C. Následně bylo provedeno promytí roztokem PBS Tween k odstranění nenavázaného antigenu a volná vazebná místa byla blokována pomocí mléka (Bio – Rad) (ředěného PBS Tween na 6% roztok). Inkubace probíhala 1 hodinu ve 37 °C. Poté byly jamky opakovaně promyty roztokem PBS Tween a nanášena testovaná séra ředěná do 3% mléka v poměru 1:200. Inkubace probíhala 1 hodinu ve 37 °C. Po promytí PBS Tween byl nanášen myší konjugát (Serotec STAR 120P) ředěný v PBS-Tween v poměru 1:1000 a destička se nechala inkubovat 1 hodinu ve 37 °C. Následovalo opakované promytí a vyvolávání reakce pomocí substrátového roztoku s tabletou orthofenylendiaminu (OPD) a peroxidem vodíku (H_2O_2). Reakce probíhala za sníženého osvětlení a byla zastavena po 5 minutách 10% roztokem kyseliny sírové (H_2SO_4).

Každý ze vzorků byl testován v doubletu a jako pozitivní kontrola bylo použito krevní sérum infikované laboratorní myši kmene BALB/c *L. major* a jako negativní kontrola neinfikované krevní sérum BALB/c myši.

Absorbance byla změřena na spektrometru při vlnové délce 492 nm.

3.12 Statistika

Preference hostitelů, mortalita a fekundita flebotomů byla testována pomocí Pearsonova chí-kvadrát testů z kontingenčních tabulek. Statistická významnost rozdílu v počtu vykladených vajec flebotomů po sání na různých druzích hostitelů byla hodnocena T - testem. Všechny statistické analýzy byly dělány pomocí statistického programu SPSS verze 23 nebo programu R (<http://cran.r-project.org>).

4 Výsledky

4.1 Xenodiagnostické pokusy a sledování infekce *L. major*

Pro tyto pokusy byl nejprve zvolen kmen FVI, izolovaný původně z lidského pacienta v Izraeli. Tento kmen je virulentní pro laboratorní myši a je standardem nejčastěji používaným pro infekce laboratorních hlodavců či v pokusech *in vitro*.

4.1.1 *A. neumanni* s infekcí *L. major* FVI

Z celkového počtu dvanácti samic bylo šest jedinců použito na průběžné sledování infektivy pro flebotomy pomocí xenodiagnostiky (skupina A) a u šesti jedinců byl sledován metodou qPCR rozvoj infekce a distribuce *L. major* do různých tkání, flebotomové na těchto jedincích nesáli (skupina B).

Infektivita pro flebotomy byla u jedinců ze skupiny A testována v 2., 5., 10, 15. a 20. týdnu PI. Po 8 – 11 dnech byly nasáté samice pitvány a jejich střevo vyšetřeno na přítomnost *L. major*.

Celkový počet vyšetřených samic flebotomů v jednotlivých týdnech PI je uveden v tabulce 2. Žádné ze střev vyšetřovaných flebotomů nebylo pozitivní na přítomnost *L. major* (tabulka 2, 3). Po skončení 20 týdnu trvajících pokusu byla zvířata usmrcena a jejich tkáně testovány na přítomnost *L. major*.

Metodou qPCR bylo otestováno 60 vzorků zvířat ze skupiny A (z týdne 20 PI) 60 vzorků zvířat ze skupiny B (2 zvířata v týdnu 10 PI, 2 v týdnu 15 PI, 2 v týdnu 20 PI) a 20 vzorků od dvou jedinců, které sloužili jako náhrada v případě úhynu ve skupině A, B. Vzorky byly negativní s výjimkou jednoho zvířete ze skupiny A, kde byla infekce přítomna na hranici detekce v levém uchu, tedy v místě inokulace leishmanií (tabulka 3). Toto pokusné zvíře ovšem v 10. týdnu PI uhynulo a dále nemohlo být pomocí xenodiagnostiky testováno.

V průběhu pokusu nebyla zaznamenána kožní léze u žádného z experimentálně nakažených zvířat.

Týden PI	Počet vyšetřených samic	Počet pozitivních samic
2	124	0
5	179	0
10	95	0
15	54	0
20	80	0
CELKEM	532	0

Tabulka 2: Celkový počet samic *P. duboscqi* (skupina A) vyšetřených na přítomnost *L. major* FVI v jednotlivých týdnech po experimentální infekci *A. neumanni* (PI)

Označení <i>A. neumanni</i>	Týden PI	Počet vyšetřených samic <i>P. duboscqi</i>	Počet pozitivních samic <i>P. duboscqi</i>	Výsledek qPCR
PP	2	30	0	
	5	29	0	
	10	13	0	
	15	9	0	
	20	18	0	Negativní
BŘ	2	20	0	
	5	24	0	
	10	20	0	
	15	13	0	
	20	13	0	Negativní
O	2	20	0	
	5	23	0	
	10*	8	0	+** (LUCH) ***
H/Z2****	2	23	0	
	5	12	0	
	10	13	0	
	15	13	0	
	20	22	0	Negativní
Z1	2	16	0	
	5	47	0	
	10	15	0	
	15	8	0	
	20	15	0	Negativní
BN	2	15	0	
	5	44	0	
	10	26	0	
	15	11	0	
	20	12	0	Negativní

Tabulka 3: Skupina A infikovaná *L. major* FVI: výsledky xenodiagnostických pokusů a přítomnost leishmanií ve tkáních *A. neumanni* (výsledky qPCR)

** - desítky *L. major* (na hranici detekce), *** – levé ucho, **** - 10. týden uhynul jedinec H a byl nahrazen jedincem Z2, který byl dále testován 10., 15., 20. týden PI, * úhyn jedince O 10. týden PI

Vzhledem k negativním výsledkům pokusů s kmenem FVI byly pro následující pokusy získány dva subsaharské isoláty *L. major*. Kmen LV 109 byl izolován z *A. niloticus*, kmen LV 110 z lidského pacienta, oba kmeny pocházejí ze Senegalu.

4.1.2 A. *neumannii* s infekcí *L. major* LV 109

Také v tomto případě byla na šesti jedincích (samic) sledována infektivita pro flebotomy v průběhu pokusu (skupina A) a u šesti jedinců (samic) byl sledován rozvoj infekce s distribucí leishmanií do různých tkání bez vystavení flebotomům v průběhu pokusu (skupina B).

U experimentálně nakažených jedinců ze skupiny A byla infektivita pro flebotomy testována v 5., 10, 15. a 20. týdnu PI a nasáté samice byly vyšetřovány na přítomnost leishmanií v den 7 - 8 po sání.

Počet vyšetřených samic *P. duboscqi* v jednotlivých týdnech PI je uveden v tabulce 4. V 5. a 10. týdnu PI byli pro flebotomy infekční dva různí jedinci *A. neumannii*. Zároveň levé ucho obou těchto jedinců bylo pozitivní na detekci *L. major* metodou qPCR.

Navíc i u dvou jedinců, kteří nebyli v průběhu pokusu infekční pro flebotomy, byli detekovány leishmanie v levém uchu metodou qPCR (u jednoho z nich byla infekce přítomna na hranici detekce). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5. U obou dvou jedinců, kteří byli infekční pro flebotomy, byla zaznamenána kožní změna na levém ušním boltci (místo inokulace leishmanií). Na ucho byly v daném místě tmavé pigmentace, ale bez viditelného otoku (Obrázek 7). U ostatních jedinců nebyla kožní léze ani jiné kožní změny zaznamenány (Obrázek 8).

Výsledky rozvoje infekce v průběhu pokusu u skupiny B jsou uvedeny v tabulce 6. Od 10. týdne byla pokusná zvířata postupně usmrcována a tkáně testovány na přítomnost *L. major*. V 15. týdnu (T15) a 20. týdnu (T20) po nákaze byla infekce na hranici detekce u jednoho jedince v levém uchu (T15) a u druhého v krvi (T20). U žádného z infikovaných jedinců nebyla zaznamenána kožní léze.

U skupiny A i B (12 ks) byla každých 5 týdnů PI odebírána krev pro testování tvorby protilátek metodou ELISA (výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.5.).

Týden PI	Počet vyšetřených samic	Počet (%) pozitivních samic
5	85	1 (1,2 %)
10	287	1 (0,3%)
15	78	0
20	148	0
CELKEM	598	2 (0,33 %)

Tabulka 4: Celkový počet vyšetřených samic *P. duboscqi* na přítomnost *L. major* LV 109 v jednotlivých týdnech PI

Označení <i>A. neumanni</i>	Týden PI	Počet vyšetřených samic <i>P. duboscqi</i>	Počet (%) pozitivních samic <i>P. duboscqi</i>	Výsledek qPCR
H	5	17	0	
	10	47	0	
	15	15	0	
	20	32	0	++* (LUCH)**
O	5	4	0	
	10	41	0	
	15	15	0	
	20	27	0	+*** (LUCH)
BŘ	5	12	0	
	10	53	0	
	15	13	0	
	20	33	0	Negativní
PZ	5	14	0	
	10	48	0	
	15	18	0	
	20	30	0	Negativní
PP	5	23	1 (4,3%)	
	10	44	0	
	15	15	0	
	20	26	0	++ (LUCH)
H2/PZ2****	5	15	0	
	10	54	1 (1,9%)	++ (LUCH)

Tabulka 5: Skupina A infikovaná *L. major* LV 109: výsledky xenodiagnostických pokusů a přítomnost leishmanií ve tkáních *A. neumanni* (výsledky qPCR) odebraných 20. týden PI

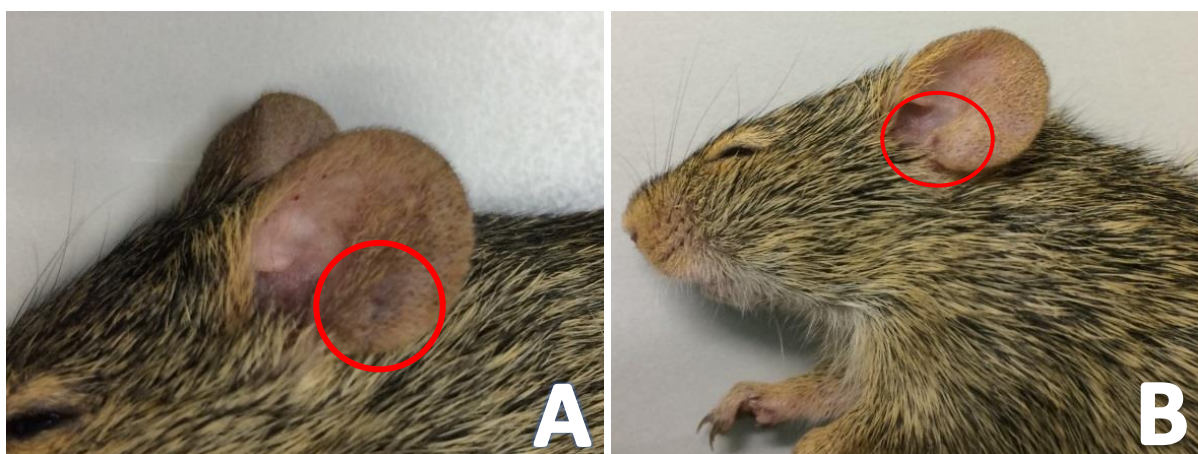
*** - desítky *L. major* (na hranici detekce), * - stovky až tisíce *L. major*, ** – levé ucho,

**** - 10. týden nebylo možné anestetizovat jedince s označením H2, byl nahrazen jedincem PZ2 – tento jedinec následně v 10. týdnu uhynul

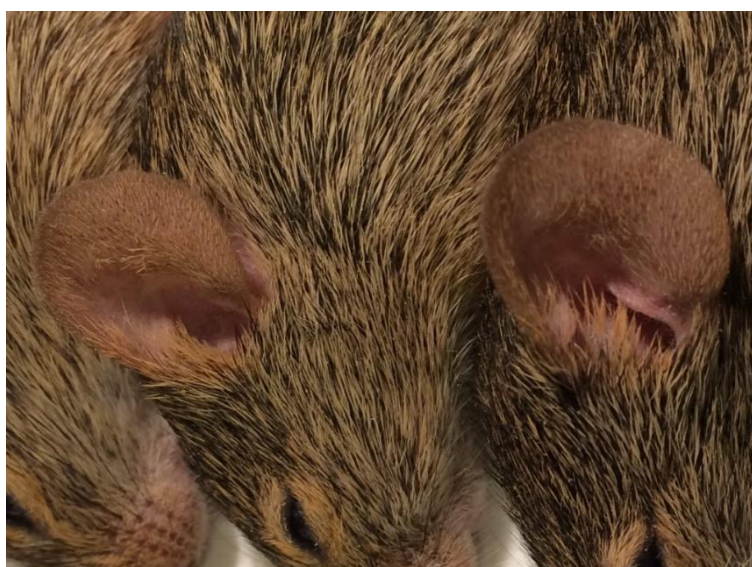
Označení <i>A. neumanni</i>	Týden PI	Výsledek qPCR
H2	T10	Negativní
BŘH	T10	Negativní
LP	T15	+* (LUCH)**
BŘ	T15	Negativní
PZ	T20	Negativní
PP	T20	+ (krev)

Tabulka 6: Skupina B infikovaná *L. major* LV109: přítomnost leishmanií ve tkáních *A. neumanni*

*+ - desítky *L. major* (na hranici detekce), ** LUCH – levé ucho



Obrázek 7: Vzhled levého ucha (kožní změna) u pokusného jedince PP infekčního pro flebotomy 5. týden PI (A) a jedince PZ2 infekčního pro flebotomy 10. týden PI (B)



Obrázek 8: Vzhled uší infikovaných jedinců bez kožních změn 20 týdnů PI

4.1.3 *A. neumanni* s infekcí *L. major* LV 110

Pokusnou skupinu tvořilo šest samic, na kterých byla v průběhu 20 týdnů trvajícího pokusu v pravidelných intervalech testována infektivita pro flebotomy. V každém týdnu, kdy probíhaly xenodiagnostické pokusy bylo 1 - 2 pokusné zvíře usmrceno a tkáně byly odebrány pro sledování rozvoje infekce metodou qPCR.

Počet vyšetřených samic flebotomů sátých na *A. neumanni* v jednotlivých týdnech PI je uveden v tabulce 7. Výsledky xenodiagnostických pokusů a výsledky qPCR odrážející rozvoj infekce jsou v tabulce 8. Žádné z experimentálně infikovaných zvířat nebylo infekční pro flebotomy. Dle qPCR mělo však všech šest jedinců v levém uchu (místo inokulace leishmanií) infekci *L. major* na hranici detekce. U žádného z infikovaných jedinců nebyla zaznamenána kožní léze.

U této skupiny byla také každých 5 týdnů PI odebírána krev pro testování tvorby protilátek metodou ELISA (výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.5.).

Týden PI	Počet vyšetřených samic <i>P. duboscqi</i>	Počet pozitivních samic
5	143	0
10	177	0
15	105	0
20	17	0
CELKEM	442	0

Tabulka 7: Celkový počet vyšetřených samic *P. duboscqi* na přítomnost *L. major* LV 110 v jednotlivých týdnech PI

Označení myši	Týden PI	Počet vyšetřených střev	Počet pozitivních samic	Výsledek qPCR
BŘ	5	0 - úhyn		+* (LUCH) **
LP	5	30	0	
	10	25	0	+ (LUCH)
PP	5	18	0	
	10	48	0	+ (LUCH)
LZ	5	15	0	
	10	38	0	
	15	35	0	+ (LUCH)
PZ	5	29	0	
	10	27	0	
	15	37	0	
	20	13	0	+ (LUCH)
OBŘ	5	25	0	
	10	40	0	
	15	33	0	
	20	4	0	+ (LUCH)

Tabulka 8: Skupina infikovaná *L. major* LV 110: výsledky xenodiagnostických pokusů a přítomnost leishmanií ve tkáních *A. neumanni* (výsledky qPCR) odebraných 10., 15., 20. týden PI

* - desítky *L. major* (na hranici detekce), ** - levé ucho

4.1.4 *A. neumanni* s infekcí *L. major* LV 109 z kultury

Ve všech předchozích pokusech byli *A. neumanni* infikováni inokulací leishmanií izolovaných z thorakálních mesenteronů flebotomů, infekční dávky se pohybovaly mezi 3 - 5x10⁶ leishmanií (cílem bylo napodobit přirozený způsob infekce zvířat). V tomto experimentu jsme ověřovali, zda vyšší infekční dávka při použití promastigotů ze stacionární fáze kultury vyvolá odlišný průběh infekce.

Pokusnou skupinu tvořili tři jedinci, na kterých byla v průběhu 15 týdnů trvajících pokusu testována infektivita pro flebotomy pomocí xenodiagnostiky. Flebotomové sáli 5. a 15. týden PI a jejich střeva byla vyšetřována 7 – 8 den po sání. 15. týden PI byla pokusná zvířata usmrcena a tkáně testovány metodou qPCR na přítomnost *L. major*.

Počet vyšetřených samic flebotomů sátých na *A. neumanni* v jednotlivých týdnech PI je uveden v tabulce 9. V 5. týdnu PI byl jeden pokusný jedinec infekční pro flebotomy, ale jeho tkáně nebyly pozitivní na qPCR. Jeden z pokusných jedinců nebyl infekční pro flebotomy, ale

v jeho levém uchu byla detekována přítomnost infekce *L. major*. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 10.

U jednoho pokusného jedince, u kterého byla detekována infekce v levém uchu qPCR, byla pozorována kožní změna na ušním boltci (Obrázek 9).

U této skupiny byla odebrána krev pro testování tvorby protilátek proti *L. major* před infekcí a po infekci na konci pokusu (výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.5.).

Týden PI	Počet vyšetřených střev	Počet (%) pozitivních samic
5	98	1 (1 %)
15	52	0
CELKEM	150	1 (0,7 %)

Tabulka 9: Celkový počet vyšetřených samic *P. duboscqi* na přítomnost *L. major* LV 109 z kultury v jednotlivých týdnech po infekci (PI)

Označení myši	Týden PI	Počet vyšetřených střev	Počet pozitivních	Výsledek qPCR
PP	5	30	0	
	15	28	0	+* (LUCH) **
PZ	5	36	0	
	15	0 - úhyn		negativní
BŘ	5	32	1 (3,1 %)	
	15	24	0	negativní

Tabulka 10: Skupina infikovaná *L. major* LV 109 z kultury: výsledky xenodiagnostických pokusů a přítomnost leishmanií ve tkáních *A. neumanni* (výsledky qPCR) odebraných 15. týden PI

* - desítky až stovky *L. major*, ** – levé ucho



Obrázek 9: Vzhled infikovaného ucha u pokusného zvířete PP pozitivního na qPCR

4.2 Sledování schopnosti *L. major* dokončit životní cyklus v *A. neumannii*

Po experimentální nákaze flebotomů a následné defekaci nestrávených zbytků krve a vykladení vajec (13 – 14 dní PI) bylo potencionálně nakaženým flebotomům umožněno sát na celém těle naivních jedinců *A. neumannii*. Nasátí flebotomové byli následně testováni metodou qPCR na přítomnost *L. major* ve střevě a v následujících týdnech pokusu byly ty části těla, kde sáli nakažení flebotomové přednostně vystavovány sání naivních flebotomů.

U pokusných jedinců *A. neumannii* byl testován koloběh *L. major* FVI a LV 109. Pro infekci izolátem *L. major* FVI bylo použito pět jedinců (dva samci, tři samice). Na jedincích potencionálně infikovaných *L. major* FVI sáli flebotomové 4., 9., 13. a 19. týden PI. Počet nakažených flebotomů dle qPCR, kteří sáli na jednotlivých *A. neumannii*, je uveden v tabulce 11. Celkový počet mikroskopicky vyšetřených flebotomů, kteří poté sáli na potenciálně nakažených hlodavcích v průběhu 19 týdnů trvajícího pokusu je uveden v tabulce 12. Žádné z 478 vyšetřených střev nebylo pozitivní na přítomnost *L. major*. V 20. týdnu PI byla pokusná zvířata usmrcena a tkáně použity na detekci parazitů metodou qPCR. V žádné z 50 tkání zvířat nebyla přítomna dle qPCR infekce *L. major*.

Pro infekci izolátem *L. major* LV 109 byli použiti dva samci. Počet nakažených flebotomů dle qPCR, které sáli na naivních *A. neumannii*, je uveden v tabulce 13. Na jednom z pokusných zvířat sáli flebotomové 6., 13. a 18. týden PI a celkový počet mikroskopicky vyšetřených střev

byl 106. Žádné ze střev nebylo pozitivní na přítomnost *L. major*. Na druhém pokusném zvířeti sáli flebotomové 6., 12., 19. týden PI a celkový počet mikroskopicky vyšetřených střev byl 102. Žádné ze střev nebylo pozitivní na přítomnost *L. major*. Obě pokusná zvířata byla na konci pokusu usmrcena a tkáně použity na detekci parazitů metodou qPCR. Žádná z 20 tkání pokusných zvířat nebyla pozitivní na *L. major*. Počet mikroskopicky vyšetřených samic flebotomů v průběhu pokusu je uveden v tabulce 14. U těchto dvou jedinců byla po skončení pokusu testována hladina protilátek v krevním séru (výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.5).

U žádného z nakažených jedinců nebyla zaznamenána kožní léze.

Označení <i>A. neumanni</i>	Počet nakažených (celkově nasátých) samic <i>P. duboscqi</i>
samice 1	11 (17)
samice 2	6 (12)
samice 3	2 (3)
samec 1	9 (13)
samec 2	4 (9)

Tabulka 11: Počet nakažených *P. duboscqi* (testováno qPCR) sátých na naivních *A. neumanni*

Týden PI	Počet vyšetřených samic	Počet pozitivních
4	174	0
9	72	0
13	103	0
19	129	0
CELKEM	478	0

Tabulka 12: Počet vyšetřených samic *P. duboscqi* vyšetřených na přítomnost *L. major* FVI v jednotlivých týdnech PI

Označení <i>A. neumanni</i>	Počet nakažených (celkově nasátých) samic <i>P. duboscqi</i>
samec 3	2 (4)
samec 4	14 (14*)

Tabulka 13: Počet nakažených *P. duboscqi* (testováno qPCR) sátých na naivních *A. neumanni* * z důvodu špatného izolačního kitu na DNA nebylo možné určit, kteří *P. duboscqi* byli nakaženi, ale ostatní jedinci z této sítiky byli vyšetřováni mikroskopicky a byla zde zaznamenána 100 % nakažených samic

Označení myši	Týden PI	Počet vyšetřených samic	Počet pozitivních samic
samec 1	6	53	0
	13	25	0
	18	28	0
samec 1	6	26	0
	12	44	0
	19	32	0
CELKEM		208	0

Tabulka 14: Počet vyšetřených samic *P. duboscqi* vyšetřených na přítomnost *L. major* **LV 109** v jednotlivých týdnech PI

4.3 Preference různých druhů hlodavců flebotomy druhu *P. duboscqi*

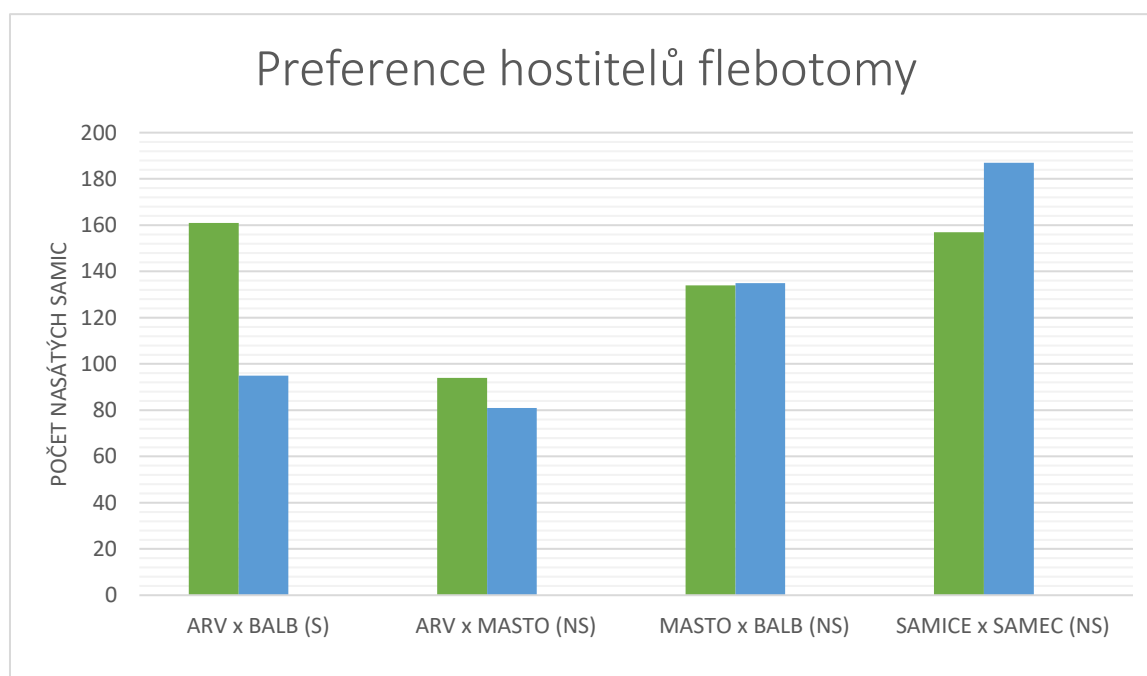
Cílem těchto pokusů bylo ověřit, do jaké míry je *A. neumanni* atraktivním hostitelem pro *P. duboscqi*, tedy přirozeného přenašeče *L. major* v subsaharské Africe. V preferenčních pokusech byla porovnávána atraktivita *A. neumanni* s *M. natalensis* (další možný rezervoárový hostitel leishmaniózy v subsaharské Africe) a laboratorní myši kmene BALB/c (na tomto kmeni je udržována laboratorní kolonie).

Nejprve jsme pokusem, kde *P. duboscqi* měli na výběr mezi samicí a samcem *A. neumanni* ověřili, že flebotomové nepreferují ani jedno z pohlaví ($\chi^2 = 2, 6163, P = 0.1058$). V následujících pokusech byly vůči sobě testovány dvojice výše zmíněných tří druhů hlodavců. Flebotomové vcelku ochotně sáli na všech druzích hlodavců. Zatímco v pokusech, kde *P. duboscqi* měli na výběr mezi *A. neumanni* a *M. natalensis* nebo *M. natalensis* a laboratorní myši kmene BALB/c nebyla zaznamenána signifikantní preference ani jednoho z druhů, tak pokud měli na výběr mezi *A. nneumanni* a laboratorní myši kmene BALB/c, preferovali signifikantně *A. neumanni* oproti BALB/c myši.

Přesné počty nasátých samic a hodnoty statistických testů jsou uvedeny v tabulce 15, výsledky jsou také graficky zpracovány v grafu 1.

Kombinace hostitelů	Počet nasátých flebotomů		Chi-square	df	P
<i>Arvicanthis</i> vs. BALB/c	<i>Arvicanthis</i>	161	17,0156	1	< 0,0001
	BALB/c	95			
<i>Arvicanthis</i> vs. <i>Mastomys</i>	<i>Arvicanthis</i>	94	0,1295	1	0,7189
	<i>Mastomys</i>	81			
<i>Mastomys</i> vs. BALB/c	<i>Mastomys</i>	134	0,0558	1	0,8084
	BALB/c	135			
samice vs. samec <i>Arvicanthis</i>	samice	157	2,6163	1	0,1058
	samec	187			

Tabulka 15: Výsledky testů hostitelské preference



Graf 1: Hostitelské preference samic *P. duboscqi* mezi *A. neumanni* (ARV), *M. natalensis* (MASTO), laboratorní myši kmene BALB/c (BALB) a mezi samičí a samcem *A. neumanni* (S) - P < 0,0001, (NS) - nesignifikantní rozdíl

4.4 Vliv krve hostitelů na mortalitu a fekunditu samic *P. duboscqi*

Flebotomové nasátí v preferenčních pokusech byli dále využiti pro srovnání mortality a fekundity samic po sání na *A. neumanni*, *M. natalensis* a BALB/c myších. Mortalita samic *P. duboscqi* byla hodnocena do 4. dne a stejně jako v preferenčních pokusech byly tedy vůči sobě srovnávány vždy dvojice hostitelů. Mortalita se pohybovala v rozpětí od 6,3 % po 37,0 % a rozdíly v mortalitě po sání na jednotlivých druzích hlodavců nebyly statisticky významné.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 16.

Část přeživších samic byla dále využita ke sledování fekundity. Samice byly 4. den po sání individuálně umístěny do skleniček a vykladená vajíčka od každé samice byla následně spočítána. Procento samic, které se vykladly, jsou uvedeny v tabulce 17. Rozdíly ve fekunditě po sání na stejných hlodavcích mezi jednotlivými pokusy zřejmě odráží hlavně odlišné mikroklima (zejména vlhkost) v pokusných dózách. Srovnatelné jsou tedy skutečně jen průměrné počty vajec v rámci jednoho pokusu, kde mohlo být opravdu zajištěno stejné mikroklima.

Signifikantně významné nebyly rozdíly v počtu vykladených *P. duboscqi* u žádné z kombinací hostitelů s výjimkou jednoho pokusu u kombinace *M. natalensis* - BALB/c myš. V tomto případě byly ale skleničky umístěny v několika velikostně odlišných dózách, proto může být výsledek ovlivněn různou vlhkostí uvnitř těchto dóz.

Průměrné, maximální a minimální počty vykladených vajec od samice *P. duboscqi* jsou uvedeny v tabulce 18 a zpracovány graficky v grafu 2. Statistický test neprokázal signifikantní rozdíly v průměrném množství vykladených vajec v závislosti na výběru hostitele.

Kombinace hostitelů	Mortalita po sání			Chi-square	df	P
<i>Arvicanthis</i> vs. BALB/c	<i>Arvicanthis</i>	12/161	7,4 %	0,118	1	0,472
	BALB/c	6/95	6,3 %			
<i>Arvicanthis</i> vs. <i>Mastomys</i>	<i>Arvicanthis</i>	25/94	26,6 %	0,007	1	0,534
	<i>Mastomys</i>	22/81	27,2 %			
<i>Mastomys</i> vs. BALB/c	<i>Mastomys</i>	44/134	32,8 %	0,522	1	0,276
	BALB/c	50/135	37,0 %			

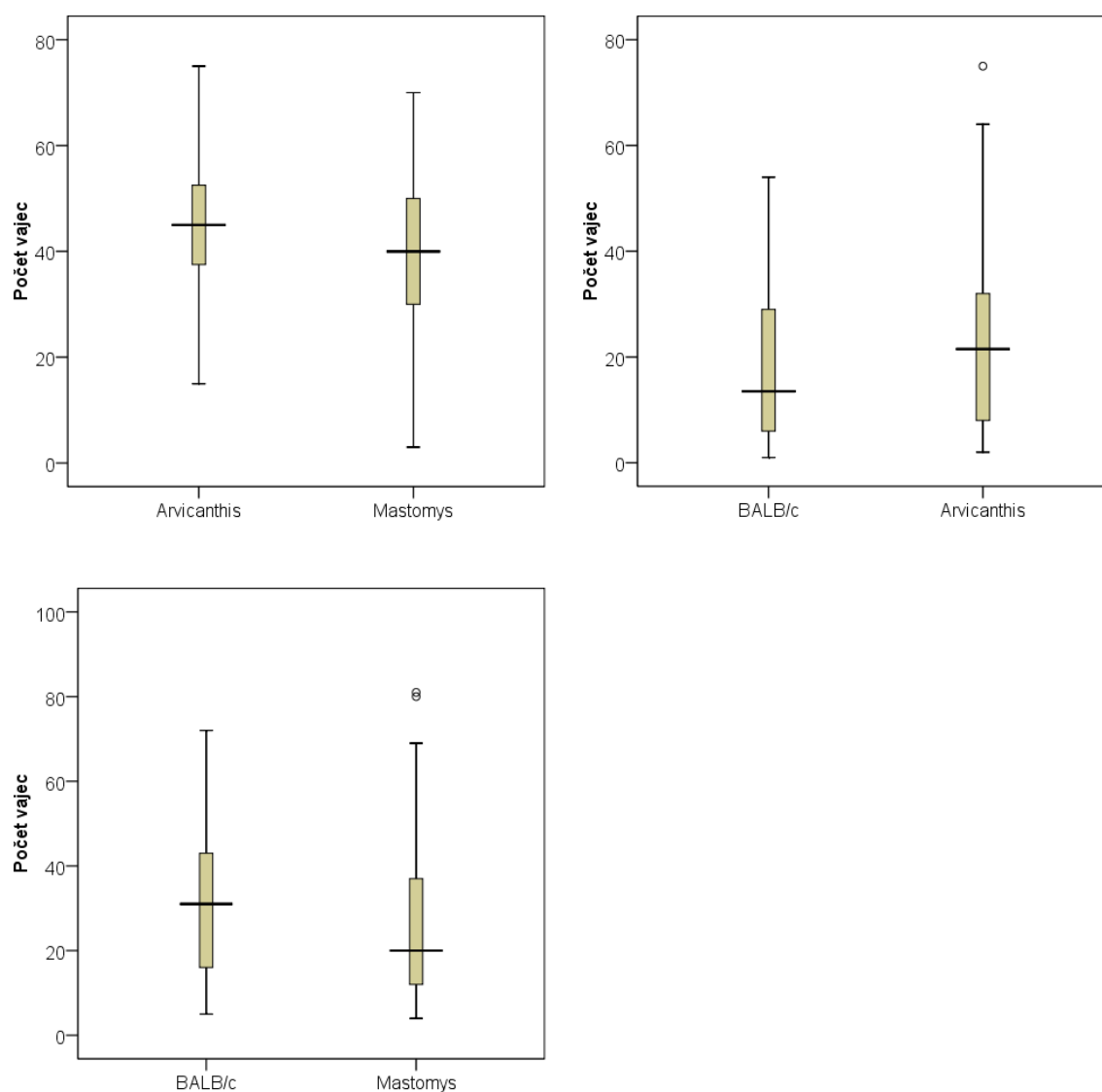
Tabulka 16: Mortalita *P. duboscqi* do 4. dne po sání na různých druzích hostitelů

Kombinace hostitelů	Fekundita			Chi-square	df	P
<i>Arvicanthis</i> vs. BALB/c	<i>Arvicanthis</i>	26/76	34,2 %	0,119	1	0,432
	BALB/c	24/76	31,6 %			
<i>Arvicanthis</i> vs. <i>Mastomys</i>	<i>Arvicanthis</i>	20/28	71,4 %	0,012	1	0,582
	<i>Mastomys</i>	14/20	70,0 %			
<i>Mastomys</i> vs. BALB/c	<i>Mastomys</i>	33/62	53,2 %	13,824	1	< 0,0001
	BALB/c	13/62	20,9 %			

Tabulka 17: Fekundita *P. duboscqi* po sání na různých druzích hostitelů

	N	Minimum	Maximum	Průměr	S.D.	t	df	P
<i>Arvicanthis</i> vs. BALB/c	26	2	75	23,9	19,3	- 0,931	48	0,357
	24	1	54	19,3	15,8			
<i>Arvicanthis</i> vs. <i>Mastomys</i>	20	15	75	45,6	15,6	1,274	32	0,212
	14	3	70	38,0	17,8			
<i>Mastomys</i> vs. BALB/c	33	4	81	27,1	22,1	0,672	44	0,505
	13	5	72	32,0	21,6			

Tabulka 18: Průměrné, maximální a minimální počty vykladených vajíček samice *P. duboscqi* v závislosti na nasátí na různých hostitelích



Graf 2: Počet vykladených vajíček samic *P. duboscqi* po sání na různých druzích hostitelů

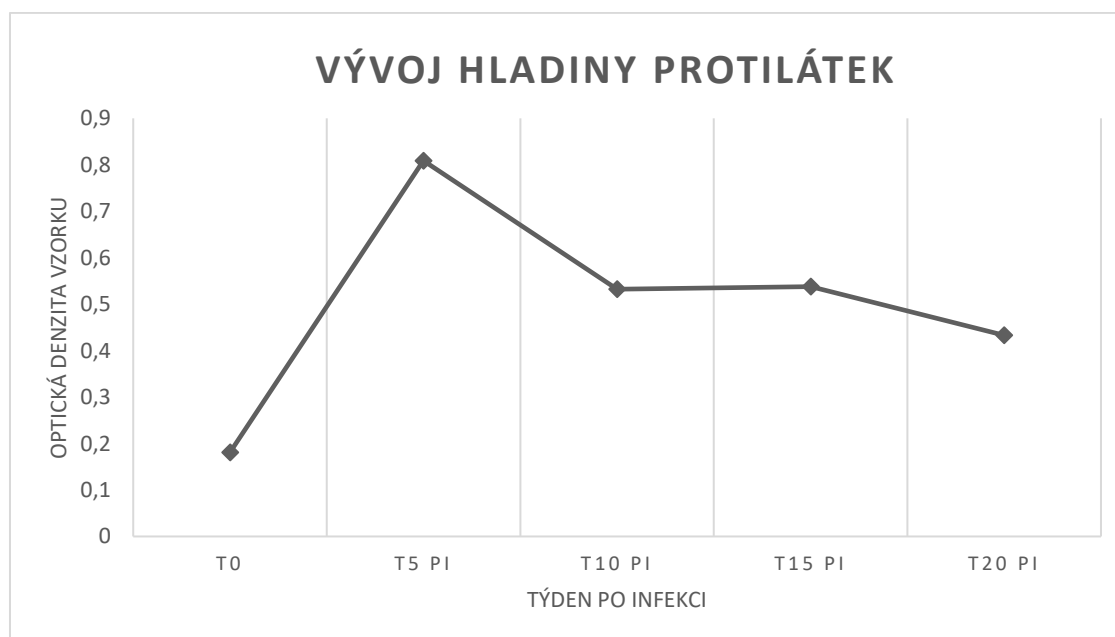
4.5 Tvorba protilátek proti *L. major*

Hladina protilátek v krevním séru byla sledována u *A. neumannii* experimentálně infikovaných *L. major* LV 109, LV 110, dále u dvou jedinců, u kterých se testoval koloběh *L. major* LV 109 (přenosové pokusy) a u třech jedinců nakažených LV 109 z kultury.

Krev *A. neumannii* infikovaných LV 109 (skupina A, B) a LV 110 byla odebrána před inokulací *L. major* a pak každý 5. týden PI. V ostatních případech byla odebírána krev před inokulací parazita a poté až po ukončení pokusu (v různých týdnech PI).

Tvorba protilátek v krevním séru v průběhu infekce byla testována pomocí metody ELISA. Zpracováno bylo 51 krevních sér od jedinců infikovaných LV 109 (skupina A, B), 20 krevních sér od jedinců infikovaných LV 110, 2 krevní séra od jedinců z přenosových pokusů, 6 krevních sér od jedinců infikovaných LV 109 z kultury.

Protilátky byly detekované metodou ELISA pouze u jednoho pokusného jedince *A. neumannii* ze skupiny infikované *L. major* LV 109 (skupina A, označení H), který nebyl infekční pro *P. duboscqi*, ale dle qPCR měl infekci v levém uchu. Hodnota optické denzity vzorku odebraného před inokulací leishmanií byla 0,2, pět týdnů PI vystoupala na 0,8, od desátého týdne PI začala klesat (0,5) až na hodnoty naměřené ve dvacátém týdnu PI (0,4). Vývoj infekce znázorňuje graf 3.



Graf 3: Vývoj hladiny protilátek proti *L. major* u *A. neumannii* (jedinec H) infikovaného *L. major* LV 109 před inokulací leishmanií (T0), 5 týdnů (T5 PI), 10 týdnů (T10 PI), 15 týdnů (T15 PI) a 20 týdnů PI (T20 PI)

5 Diskuze

Terénní výzkumy posledních desetiletí přinášely opakované nálezy infikovaných hlodavců rodu *Arvicanthis* různými druhy leishmanií (Hoogstraal a Heyneman, 1969; Haile a Lemma; 1977; Chance *et al.*, 1978; Githure *et al.*, 1986; El - Hassan *et al.*, 1993; Githure *et al.*, 1996; Elnaiem *et al.*, 2001; Kassahun *et al.*, 2015). Z ekologického hlediska splňují tito hlodavci kritéria rezervoárových hostitelů dle Ashford (1996). Tedy jsou to hlodavci hojní, tvoří velké procento v zastoupení savčích druhů na dané lokalitě, žijí v koloniích, jsou dlouhověcí, tedy schopni přežít období, kdy k přenosu leishmanií nedochází. Další vlastnosti charakterizující rezervoárové hostitele lze testovat laboratorně, což bylo i náplní této práce.

Sledovali jsme, nakolik jsou hlodavci druhu *A. neumanni* hostitelé atraktivní pro flebotomy, jak je pro ně nákaza *L. major* patogenní, zda jsou leishmanie v jejich těle lokalizované příhodně pro nákazu sajícího flebotoma a nakolik jsou infikovaní jedinci schopni flebotomy opravdu nakazit.

Atraktivitu pro flebotomy jsme v této práci testovali preferenčními pokusy, kde jsme srovnávali atraktivitu tří druhů hlodavců pro flebotomy druhu *P. duboscqi*, kteří se přirozeně vyskytují v endemických oblastech leishmaniózy v subsaharské Africe a jsou považováni za prokázané vektory *L. major* (Killick – Kendrick, 1990). Pro pokusy byli použiti *A. neumanni*, *M. natalensis* (další potencionálně rezervoárový hostitel leishmaniózy) a laboratorní myš kmene BALB/c. Samice *P. duboscqi* měly možnost výběru vždy mezi dvojicí druhů hostitelů. Dá se předpokládat, že pro *P. duboscqi* budou obecně hlodavci atraktivní, protože je to druh, který je v přírodě nejčastěji nalézán právě v norách hlodavců nebo v jejich okolí (Dedet *et al.* 1980; Mutinga *et al.*, 1990; Basimike *et al.*, 1992; Ngumbi *et al.*, 1998; Valenta *et al.* 2000).

V našich pokusech sáli flebotomové opravdu ochotně na všech třech druzích hlodavců, ovšem zaznamenali jsme signifikantní rozdíl ve výběru hostitele v případě, že samice *P. duboscqi* měly na výběr mezi laboratorní myší kmene BALB/c a *A. neumanni*, který byl samicemi *P. duboscqi* více preferován. Přestože chování flebotomů v laboratorních podmínkách se může lišit od chování v přírodě, tak atraktivitu myšovitých hlodavců pro *P. duboscqi* i v přirozených podmínkách potvrzuje práce Mutinga *et al.* (1986).

V pracích, kde byla laboratorně testována hostitelská preference (Harre *et al.*, 2001; Chagas *et al.*, 2007; Macedo - Silva *et al.*, 2014), měli flebotomové pouze možnost nasát se na předloženém hostiteli nebo nesát vůbec, ale neměli možnost výběru mezi hostiteli, tak jako

v námi prováděných experimentech. Tito autoři často zaznamenali výraznější rozdíly v preferencích možná i proto, že srovnávali různé druhy savců, které se od sebe v mnoha ohledech liší, jako například preferenci sání *Lu. cruzi* na člověku, křečkovci a vačici. Abychom předešli ovlivnění hostitelské preference velikostí pokusných zvířat, používali jsme pro pokusy, kde mezi sebou byli porovnáváni výrazně větší divoké druhy hlodavců (*A. neumani*, *M. natalensis*) a laboratorní druh (myš kmene BALB/c), po dvou kusech laboratorní myši (2 x 20g) proti jednomu jedinci divokého druhu hlodavce. Dle studie Hassan *et al.* (2009) ovšem samotná velikost těla s množstvím přitahovaných flebotomů nekoreluje. Výsledky některých studií dokonce ukazují, že některé druhy epidemiologicky významných druhů flebotomů preferují sání na malých druzích, jako jsou především hlodavci oproti větším živočichům (Maia *et al.*, 2013). Důležitější ve výběru hostitele může být spíše než velikost těla množství vyloučeného CO₂ a produkce různých hostitelsky specifických pachů (Constantini *et al.*, 1996).

V práci Hassan *et al.* (2009) je v preferenčních pokusech s *P. orientalis* testován *A. niloticus* (myš nilská), jako jeden z potencionálně rezervoárových druhů *L. donovani* ve východní Africe. Jedinci *A. niloticus* byli opakovaně v přírodě nalezeni infikováni druhem *L. donovani* přenášeným v této oblasti právě *P. orientalis* (Hoogstraal a Heyneman, 1969; El – hassan *et al.*, 1993; Elnaiem *et al.*, 2001; Kassahun *et al.*, 2015). *A. niloticus* sice byl pro flebotomy včetně *P. orientalis* atraktivní, ale ze sledovaných savčích druhů nejméně. To nemusí nutně znamenat, že nemůže hrát roli rezervoárového hostitele, byť autor uvádí na základě nízké preference tohoto hostitele, že *A. niloticus* je pravděpodobně jen náhodným hostitelem *L. donovani*. Důležité ovšem je, že na sledovaném území je *A. niloticus* nejhojnějším druhem z testovaných druhů v této studii.

Že je v přírodě preference hostitelů ovlivňována jak oblibou krevního zdroje, tak i dostupností různých zdrojů, dokládá nepřímo studie Gebresilassie *et al.* (2015). Autoři v terénních pokusech hostitelské preference testovali, která zvířata budou nejvíce přitahovat flebotomy *P. orientalis* (a jiné druhy flebotomů). V prvním pokusu, kde testovali velká hospodářská zvířata, přitahoval z vybraných zvířat *P. orientalis* sice nejvíce skot, ale atraktivní byla i ostatní dostupná zvířata. V druhém pokusu porovnávali atraktivitu pouze malých divokých zvířat a *P. orientalis* byl opět přitahován všemi dostupnými hostiteli, ale i zde se projevila preference jednoho druhu (pozemní druh veverky *Xerus rutilus*). Stejně tak Gebre – Michael *et al.* (2010) uvádí, že není jasné, zda si *P. orientalis* výrazně více vybírá skot (který je v endemických oblastech hojně chován) na základě preference nebo jen z důvodu vysoké

abundance a dostupnosti tohoto krevního zdroje. To, že výběr hostitele ovlivňuje spíše dostupnost zdroje, než specifická atraktivita nějakého druhu dokládá dále studie Bongiorno *et al.* (2003) zabývající se hostitelskou preferencí flebotomů ve střední Itálii, v oblasti s výskytem *L. infantum*, původcem viscerální leishmaniózy. Některé studie ale dokládají i situace, kdy na určitých druzích hostitelů flebotomové nesáli vůbec i přes jejich dostupnost. Ve studiu Macedo – Silva *et al.* (2014) se jihoamerický druh flebotomů *Lu. longipalpis*, který je považován za potravního oportunistu, vůbec nenasál na domácí kočky a ve studii Quate (1964) nesál žádný z flebotomů *P. orientalis* na *M. natalensis*. Naše studie potvrdila ochotu *P. duboscqi* sát na různých druzích hlodavců a vyšší preference *A. neumanni* nepřímo podporuje možnou vazbu *P. duboscqi* na tento druh i v přírodě.

S výběrem a preferencí určitých hostitelů úzce souvisí vliv jejich krve na mortalitu samic po sání a množství vykladených vajíček (fekundita). V této práci jsme sledovali mortalitu u samic *P. duboscqi* z preferenčních pokusů 4. den po sání. Nezaznamenali jsme statisticky významné rozdíly v mortalitě po sání podle toho, jaký hostitel byl flebotomy vybrán. Harre *et al.* (2001) sledoval mortalitu 1. den po sání u blízce příbuzného druhu *P. papatasi* a udává průměrnou hodnotu 4,7 % při sání na různých malých druzích savců (včetně hlodavců). V našich pokusech se mortalita po sání pohybovala mezi 6,3 % (po nasátí na laboratorní myši srovnávané s *A. neumanni*) až 37 % (opět po nasátí na laboratorní myš srovnávané s *M. natalensis*). Mortalita po sání byla tedy také poměrně nízká a rozdíly byly způsobeny nejspíše mírně odlišnými mikroklimatickými podmínkami v každém z pokusů (vlhkost uvnitř pytlíku, kde byla umístěna síťka s flebotomy, aj.). Sádlová *et al.* (2003), která testovala mortalitu po sání na třech druzích hostitelů stejnou metodikou, jaká byla použita v této práci, také nezaznamenala vliv výběru hostitele na mortalitu samic po sání, přestože zde by se daly očekávat i větší rozdíly, protože byly srovnávané tři podstatně odlišné druhy savců oproti třem druhům hlodavců v této práci.

V pokusech testujících fekunditu samic po nasátí na různých hostitelích jsme sice zaznamenali statisticky významný rozdíl v množství vykladených samic, které si vybírali mezi *M. natalensis* a laboratorní myši a to ve prospěch samic sátých na *M. natalensis*, ale tento výsledek byl nejspíše způsoben odlišným mikroklimatem v pokusných dózách. Srovnatelné jsou tedy jen průměrné počty vykladených vajec v rámci jednoho pokusu, kde mohlo být opravdu zajištěno stejné mikroklima a zde jsme nezaznamenali žádný signifikantní rozdíl vlivu výběru hostitele na množství vykladených vajec. V našich pokusech byl nejvyšší zaznamenaný

průměrný počet vajec od jedné samice 45, a to po sání na *A. neumanni*. To převyšuje průměrný počet vajec 26, ve studii Macedo - Silva *et al.* (2014) od samic flebotomů *Lu. longipalpis* sátých na nejvíce preferovaném hostiteli v pokusu – hlodavci druhu *Galea spixii* z čeledi morčatovití (Caviidae). Stejně tak toto číslo převyšuje průměrný počet vykladených vajec, 17, ve studii Harre *et al.* (2001) od samic flebotomů *P. papatasi*, které sály na jimi nejvíce preferovaném hostiteli v pokusu – morčeti (*Cavia* sp.). Taktéž Sádlová *et al.* (2003) uvádí po sání u nejvíce preferovaného hostitele v pokusu (člověka) průměrný počet vykladených vajec 19. Vyšší počet průměrně vykladených vajec od jedné samice, 31, zaznamenal Noguera *et al.* (2006) v pokusech se samicemi druhu *Lu. ovallesi*, které kladly nejvyšší průměrný počet vajec po nasátí na kuřeti. Podobně vysoký průměrný počet vajec jako v této práci, 38, zaznamenal Ward (1977) po sání na laboratorním křečkovi. Ze získaných výsledků vyplývá, že samice *P. duboscqi* kladou po sání na *A. neumanni* poměrně vysoký počet vajec, i když není průkazně vyšší než počet vajec kladených po sání na *M. natalensis* a laboratorní myši. Výsledky získané z laboratorních pokusů však nemusejí zobrazovat reálnou situaci v přírodě.

Hlavní částí této práce bylo testování infekitivity *A. neumanni* experimentálně nakažených *L. major* pro flebotomy druhu *P. duboscqi* a sledování schopnosti *L. major* dokončit životní cyklus v tomto hostiteli. Infekční dávky pro experimentální nákazy *A. neumanni* byly tvořeny thorakálními částmi mesenteronu experimentálně nakažených *P. duboscqi* a homogenátem slinných žláz, které podporují rozvoj infekce (Titus a Ribeiro, 1988; Belkaid *et al.*, 1998). Infekční dávka byla aplikována intradermálně do ušního boltce, což imituje přirozený způsob nákazy, kdy jsou leishmanie vystaveny lokální imunitní reakci v kůži (Belkaid *et al.*, 2000). Takto vytvořenou a inokulovanou infekční dávkou lze co nejpřirozeněji napodobit reálnou situaci v přírodě a zároveň je možné kontrolovat místo vpichu a množství inokulovaných parazitů. Stejným způsobem infekce (bez přidání homogenátu slinných žláz) dosáhla Sádlová *et al.* (2015) vysoké infekitivity laboratorních myší pro *P. orientalis* a infekce u těchto myší diseminovala z místa inokulace do dalších tkání. Oproti tomu v jiných podobných studiích není inokulum vytvořeno ze střev infikovaných flebotomů, ale z kultury promastigotů leishmanií ve stacionární fázi růstu (Travi *et al.*, 2002; Elfari *et al.*, 2005; Hanafi *et al.*, 2013). Pro srovnání průběhu infekce u *A. neumanni* v závislosti na způsobu získání infekční dávky jsme použili tři jedince a infikovali je také tímto způsobem. Množství leishmanií v takto vytvořené dávce je vyšší (obvykle $10^7 - 10^8$) než u infekční dávky získané z infikovaných střev flebotomů (obvykle $10^4 - 10^5$), přesto jsme u *A. neumanni* nezaznamenali symptomatický průběh infekce,

ani zvýšenou infektivitu pro flebotomy. V této práci jsme testovali i nákazu tím nejprůirozenějším způsobem – sáním infikovaného flebotoma na naivním hostiteli. Tento způsob se zdá nejméně vhodným, protože se nepodařilo infikovat žádného pokusného jedince a při tomto způsobu infekce ani nelze kontrolovat infekční dávku.

Pro experimentální infekce hlodavců byl nejprve zvolen izraelský kmen *L. major* původně izolovaný z lidského pacienta, který je virulentní pro laboratorní myši a je standardem nejčastěji používaným pro infekce laboratorních hlodavců či v pokusech *in vitro*. Z výsledků pokusů vyplývá, že tento kmen není schopen udržet se v *A. neumanni* (pouze u jednoho pokusného jedince byla v místě inokulace leishmanií zaznamenána infekce na hranici detekce dle qPCR) a experimentálně nakažení hlodavci tudíž nejsou infekční pro flebotomy *P. duboscqi*. Tato skutečnost může souviset s odlišným geografickým původem parazita a hostitele. Že je to důležitý faktor a vztah mezi parazitem a hostitelem může být v tomto smyslu velmi specifický, ukázala studie genetické a biologické diverzity v populaci *L. major* (Elfari *et al.* 2005). Kmen *L. major* pocházející z rezervoárových hostitelů ze Střední Asie (*R. opimus*) nebyl schopen laboratorně nakazit rezervoárové hostitele Blízkého východu (*Ps. obesus*) a opačně. Na druhou stranu pro druh *Me. libycus* byly infekční izoláty z Afriky, Blízkého východu i Střední Asie.

Vzhledem k negativním výsledkům pokusů s izraelským kmenem FVI byly pro následující pokusy získány dva subsaharské kmeny *L. major* ze Senegalu. Kmenem izolovaným z *A. niloticus* se podařilo experimentálně infikovat pět jedinců ze dvanácti *A. neumanni* a v xenodiagnostických pokusech jsme zaznamenali infektivitu 0,3 % pro *P. duboscqi*. Druhým senegalským kmenem, izolovaným z člověka, se podařilo infikovat všechny pokusné jedince, infekce však byly slabé, na hranici detekce pomocí qPCR a žádný *P. duboscqi* se tedy z těchto jedinců nenakazil.

Podobné experimenty prováděla Svobodová *et al.* (2003) s experimentálně nakaženými krysami obecnými (*Rattus rattus*) *L. tropica*. Infektivita experimentálně nakažených jedinců pro flebotomy *P. sergenti* se pohybovala mezi 0 – 7 %. Stejně jako v našich experimentech byly krysy inokulovány do ušního boltce promastigoty *L. tropica*. U jedinců se nevyvinula žádná viditelná známka onemocnění (kožní léze) a přesto byli infekční pro *P. sergenti*. Sádlová *et al.* (2015) u laboratorních myši experimentálně infikovaných *L. donovani* také nezaznamenala žádné viditelné známky infekce, přestože infektivita těchto myši pro *P. orientalis* se pohybovala okolo 20 %. Podobnou hodnotu infekivity (0 - 11 %) pro flebotomy *P. perniciosus* zaznamenali Molina *et al.* (2012) i u přirozeně nakažených potencionálně rezervoárových hostitelů - zajíců

(*Lepus granatensis*) ve Španělsku. Stejně jako v případě výše popsaných experimentálních nálezů byli nakažení zajíci asymptomatictí.

V našich experimentech jsme u jedinců *A. neumanni*, kteří byli infekční pro *P. duboscqi*, zaznamenali kožní změny v místě inokulace, ale stejně tak jsme zaznamenali kožní změnu na uchu u jedince, který infekční pro *P. duboscqi* nebyl. Zároveň i jedinec bez jakýchkoliv kožních změn v místě inokulace leishmanií byl infekční pro *P. duboscqi*. Kožní léze u rezervoárových hostitelů nejsou spolehlivým ukazatelem infekce ani v přírodních podmínkách, což také dokládá studie Fichet – Calvet *et al.* (2013). Tito autoři pozorovali kožní léze u některých jedinců *Ps. obesus* v Tunisu nakažených *L. major*, ale u 35 % nakažených zvířat žádné kožní léze zaznamenány nebyly. Odlišnou vnější manifestaci onemocnění u rezervoárových hostitelů mohou působit i různé kmeny *L. major* (Elfari *et al.*, 2005). V případě infekce hlodavců kmenem z Keni se v závislosti na druhu buď kožní léze nevytvořila (*R. opimus*) nebo byla pozorována jen nodulární léze (*Me. libycus*, *Ps. obesus*), která se v průběhu 6. měsíců zhojila. Naopak kmen z Izraele způsobil u některých druhů hlodavců (*Me. libycus*, *Ps. obesus*) ulcerující lézi a postupnou destrukci ušního boltce a u jiného zůstala infekce v místě inokulace bez kožních změn (*R. opimus*).

Stejně jako divoké druhy hlodavců vykazují odlišnou vnímavost k infekci *L. major* různé kmeny laboratorních myší. Nejčastěji používaný model pro studium kutánní leishmaniózy – myši kmene BALB/c jsou k nákaze vysoce citlivé a vykazují po nákaze *L. major* progresivně se vyvíjející onemocnění s nehojící se lézí v místě inokulace a diseminací do vnitřních orgánů (Belkaid *et al.*, 2000). Takový to průběh s vysokou virulencí patogena, však nemůže mít nákaza *L. major* u rezervoárových hlodavců v přírodě. V této práci jsme u infikovaných jedinců *A. neumanni* nezaznamenali žádné výrazné známky onemocnění a infekce *L. major* byla převážně detekována pouze v místě inokulace (levý ušní boltec) a bez šíření do okolních tkání.

Roli jiného potencionálně rezervoárového hlodavce druhu *Proechimys semispinosus* v přenosu leishmanií Jižní Americe testoval Travi *et al.* (2002). Ve studii byli v přírodě odchycení hlodavci *Pr. semispinosus* experimentálně nakaženi *L. panamensis*, původcem kutánní leishmaniózy a byla testována jejich infektivita pro *Lu. longipalpis* a *Lu. youngi*. Autoři zaznamenali v místě inokulace nodulární, neulcerující lézi, která se do 7. týdne po infekci zhojila. Autoři prováděli xenodiagnostické pokusy čtvrtý a sedmý týden po infekci. Infektivitu dvou experimentálně nakažených jedinců *Pr. semispinosus* pro *Lu. youngi* zaznamenali ve čtvrtém týdnu po infekci, ale stejně jako v naší práci byl počet nakažených flebotomů velmi

malý (1 z 20 nasátých, 1 z 48 nasátých). V 7. týdnu po infekci již nezaznamenali infektivitu *Pr. semispinosus* pro flebotomy.

V této práci jsme pozorovali infektivitu *A. neumanni* pro *P. duboscqi* do 10. týdne PI, přestože u některých jedinců byla *L. major* detekována metodou qPCR ještě i na konci pokusu v 20. týdnu PI. U jednoho z infikovaných jedinců byly detekovány protilátky proti *L. major* metodou ELISA, přitom jejich nejvyšší hladina byla zaznamenána v 5. týdnu PI a v dalších týdnech PI až do ukončení pokusu už docházelo k jejich poklesu. Na základě studií dělaných převážně na psech domácích nakažených *L. infantum*, kde byla sledována séropozitivita psů a schopnost těchto zvířat nakazit flebotomy vyplývá, že protilátky proti leishmaniím samy o sobě nejsou dobrým ukazatelem toho, zda je nakažené zvíře infekční pro flebotomy a je tedy významné v epidemiologii onemocnění (Courtenay *et al.*, 2002). To se shoduje s výsledky naší práce, kdy jeden pokusný jedinec *A. neumanni* měl vytvořené protilátky proti *L. major*, dle qPCR měl nákazu *L. major* v levém uchu, ale v žádném z pokusných týdnů nebyl infekční pro *P. duboscqi*.

Stejně jako u infikovaných jedinců *Arvicanthus* sp. nacházených v přírodě (Hoogstraal a Heyneman, 1969; Haile a Lemma; 1977; Githure *et al.*, 1986; Kassahun *et al.*) nevykazovali ani námi infikovaní pokusní jedinci v průběhu infekce žádné viditelné známky onemocnění, což svědčí o nízké patogenitě *L. major* pro *A. neumanni*, která je podmínkou možnosti zapojení *A. neumanni* do životního cyklu tohoto parazita. Poměrně krátké trvání infekivity a schopnost nakazit malé procento flebotomů může opět souviset s faktem, že druh *A. neumanni* se vyskytuje pouze na území od Etiopie a Somálska po Keňu a Tanzánii (východní Afrika) a nemusí být méně vnímavý k izolátům *L. major* pocházejícím ze Senegalu (západní Afrika). Každopádně základní kritérium rezervoárového hostitele dle Silva *et al.* (2005), které musí být vždy splněno – doba přežívání parazita v rezervoárovém hostiteli je dostatečně dlouhá natolik, aby došlo k vývoji do infekčních stádií parazita a infekci vektorů, druh *A. neumanni* splňuje. Fakt, že vnímavost k parazitům vykazovali jen někteří pokusní jedinci v našich experimentech nejspíše souvisí s přirozenou genetickou variabilitou těchto hostitelů (Blackwell, 1996).

Ve studiích, které zachytili infikované jedince rodu *Arvicanthus*, je nejčastěji uváděn druh *A. niloticus*, který má oproti *A. neumanni* výrazně širší areál rozšíření v subsaharské Africe a jeho potenciál hrát roli v koloběhu *L. major* a jiných druhů leishmanií je o to větší. *A. niloticus* se hojně vyskytuje i v západní Africe, v endemických oblastech kutánní leishmaniózy (shrnuto v Boakye *et al.*, 2005).

Výsledky této práce naznačují, že *A. neumanni* je schopen se některými izoláty *L. major* nakazit a být pak infekční pro vektory druhu *P. duboscqi*, přestože ve velmi malém procentu případů. Vezme – li se v potaz, že rod *Arvicanthis* patří k nejhojnějším savcům obývajícím subsaharskou Afriku a žije i v blízkosti lidských obydlí je možné, že jeho role v koloběhu *L. major* a jiných leishmanií, jako je *L. donovani*, může být významná. Tuto hypotézu je ovšem nutné potvrdit dalšími experimenty, například s použitím jiných izolátů *L. major* (a dalších druhů leishmanií) a také dalších druhů rodu *Arvicanthis*, v první řadě je nadějným kandidátem pro další výzkum nejčastěji zmiňovaný druh *A. niloticus*.

6 Závěrečné shrnutí

- Infektivita *L. major* pro *A. neumanni* se lišila v závislosti na použitém izolátu:
 - izraelský kmen FVI nebyl schopen vývoje v *A. neumanni*, tudíž tito jedinci nebyli v průběhu pokusu infekční pro flebotomy.
 - senegalským kmenem LV 109 bylo úspěšně infikováno 42 % (5/12) jedinců *A. neumanni* a 40 % (2/5) jedinců použitých na xenodiagnostické pokusy vykazovalo infektivitu pro flebotomy. Z celkového počtu 598 vypitvaných *P. duboscqi* bylo pozitivních 0,3 % samic.
 - senegalským kmenem LV 110 se podařilo infikovat všechny pokusné jedince (6/6), ale množství detekovaných parazitů (dle qPCR) bylo většinou velmi nízké a tato zvířata nebyla v celém průběhu pokusu infekční pro flebotomy.
- infikovaní jedinci **nevykazovali v průběhu infekce výrazné vnější známky onemocnění** (kožní léze), i když u některých jedinců byla pozorována drobná kožní změna v místě inokulace. Infekční pro *P. duboscqi* byl ovšem i jedinec bez jakýchkoliv vnějších projevů onemocnění.
- infekce *L. major* byla metodou qPCR detekována převážně pouze v levém ušním boltci, tedy v místě inokulace parazitů a **nedocházelo k disseminaci parazitů** do dalších tkání.
- Infektivita pro flebotomy byla pozorována pouze v 5. až 10. týdnu týdnů PI, kdy byla také u jednoho z infikovaných jedinců zjištěna zvýšená hladina protilátek proti *L. major* v krevním séru.
- Použití odlišné infekční dávky (10^7 promastigotů z kultury oproti $3 - 5 \times 10^4$ leishmanií z mesenteronu experimentálně nakažených flebotomů) nezměnilo pattern onemocnění (nedošlo k disseminaci parazitů do jiných tkání) a infektivita pro flebotomy byla také srovnatelná (0,3 vs. 0,7 %).
- *A. neumanni* byl pro *P. duboscqi* atraktivním hostitelem a byl více preferován oproti laboratorní myši kmene BALB/c. Druhý druh potencionálně rezervoárového afrického hlodavce *M. natalensis* byl pro *P. duboscqi* stejně atraktivní jako *A. neumanni*.
- Mortalita a fekundita samic *P. duboscqi* po sání na *A. neumanni*, *M. natalensis* a laboratorní myši měly srovnatelnou hodnotu a nebyly tedy výrazně ovlivněny zdrojem krve.

Celkové shrnutí:

Experimentální infekce *A. neumanni* prokázaly, že tento druh hlodavce může sloužit jako hostitel *L. major*. Izoláty pocházející ze Senegalu přetrvaly v místech inokulace do 20. týdne PI, aniž by zvířata vykazovala výrazné známky onemocnění. Mezi 5. a 10. týdnem PI byli někteří pokusní jedinci schopni nakazit sající flebotomy. Procento infikovaných flebotomů bylo sice nízké, ale je pravděpodobné, že izolát přímo z areálu rozšíření *A. neumanni*, tedy z východní Afriky (ten jsme bohužel neměli k dispozici) by se v těchto hlodavcích mohl vyvíjet ještě lépe.

Tato laboratorní studie tedy podporuje hypotézu, že *A. neumanni* splňuje kritéria rezervoárového hostitele a hraje roli v přenosu *L. major*. K definitivnímu závěru o roli hlodavců rodu *Arvicanthis* v přenosu leishmanií by ovšem byly žádoucí další experimenty, například s použitím jiných izolátů *L. major* (a dalších druhů leishmanií) a také dalších druhů rodu *Arvicanthis*, zejména pak nejrozšířenějšího druhu *A. niloticus*.

7 Použitá literatura

- Abai, M. R., Oshaghi, M. A., Tajedin, L., Rassi, Y., Akhavan, A. A.,** (2010). Geographical distribution and ecological features of the great gerbil subspecies in the main zoonotic cutaneous leishmaniasis foci in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 800 – 803.
- Abbasi, I., Cunio, R., Warburg, A.,** (2009). Identification of Blood Meals Imbibed by Phlebotomine Sand Flies Using Cytochrome *b* PCR and Reverse Line Blotting. *Vector - Borne and Zoonotic Diseases*. 9, 79-86.
- Abdoli, A., Maspi, N., Ghaffarifar, F.,** (2017). Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF- β . *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 51, 15-26.
- Akhavan, A. A., Hossein, M., Khamesipour, A., Alimohammadian, M. H., Rassi, A., Bates, P., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G., Arandian, M. H., Abdoli, H., Jalali-zand, N., Jafari, R., Shareghi, N., Ghanei, M., Yaghoobi-Ershadi, M. R.,** (2010b). *Leishmania* species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Experimental Parasitology* 126, 552 – 556.
- Akhavan, A. A., Yaghoobi – Ershadi, M. R., Mirhendi, H., Alimohammadian, M. H., Rassi, Y., Shareghi, N., Jafari, R., Arandian, M. H., Abdoli, H., Ghanei, M., Jalali – zand, N., Khamesipour, A.,** (2010a). Molecular epizootiology of rodent leishmaniasis in a hyperndemic area of Iran. *Iranian Journal of Public Health* 39.1, 1- 7.
- Alexander, B., Lopes de Carvalho, R., McCallum, H., Pereira, M. H.,** (2002). Role of the Domestic Chicken (*Gallus gallus*) in the Epidemiology of Urban Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 8, 1480 – 1485.
- Alexander, B., Lozano, C., Barker, D. C., McCann, S. H. E., Adler, G. H.,** (1998). Detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Tropica* 69, 41 – 50.
- Al – Jawabreh, A., Dumaidi, K., Ereqat, S., Al – Jawabreh, H., Nasseredin, A., Azmi, K., Barguthy, F., Sawalha, S., Salah, I., Abdeen, Z.,** (2017). Molecular epidemiology of human cutaneous leishmaniasis in Jericho and its vicinity in Palestine from 1994 to 2015. *Infection Genetics and Evolution* 50, 95 – 101.
- Alvar, J., Vélez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M.,** (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One* 7(5): e35671.
- Alvar, J., Yactay, S., Bern, C.,** (2006). Leishmaniasis and Poverty. *Trends in Parasitology* 22, 552– 557.
- Anderson, J., M., Samake, S., Jaramillo-Gutierrez, G., Sissoko, I., Coulibaly, Ch., A., Traoré, B., Soucko, C., Guindo, B., Diarra, D., Fay, M., P., Lawyer, P., G., Doumbia, S., Valenzuela, J., G., Kamhawi, S.,** (2011). Seasonality and prevalence of *Leishmania major* infection in *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire from two neighboring villages in Central Mali. *Plos Neglected Tropical Disease* 5.
- Ashford, R.W.,** (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* 14, 523–532.
- Ashford, R. W.,** (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonose. *Internal Journal of Parasitology* 30, 1269 – 1281.
- Ashford, R. W., Bettini, S.,** (1987). Ecology and epidemiology: Old World. V: W. Peters and R. Killick-Kendrick, *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* Vol. 1, Academic press, London 365–424.
- Bâ, K., Kane, M., Gauthier, P., Granjon, L.,** (2012). Ecology of a typical West African Sudanian savannah rodent community. *African Journal of Ecology* 51, 447 – 455.
- Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M., Cubría, J. C., Ordóñez, D.,** (1998). The Pharmacology of Leishmaniasis, *General Pharmacology: The Vascular System* 30, 435 – 443.

- Basimike, M., Mutinga, M. J., Kumar, R.,** (2011). Habitat preference and seasonal variations of phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Marigat Area, Baringo District, Kenya. *International Journal of Tropical Insects Science* 13, 307 – 314.
- Bates, P. A.,** (2007). Transmission of metacyclic promastigotes of phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 37, 1097 – 1106.
- Bekele, A., Capanna, E., Corti, M., Marcus, L. F., Schlitter, D. A.,** (1993). Systematics and geographic variation of Ethiopian *Arvicanthis* (Rodentia, Muridae). *Journal of Zoology* 230, 117 – 134.
- Bekele, A., Leirs, H., Verhagen, R.,** (2003). Composition of rodents and damage estimates on maize farms at Ziway, Ethiopia. V: Singleton, G. R., Hinds, L. A., Krebs, C. J., Spratt, D. M., Rats, mice and people: rodent biology and management, Australian Centre for International Agricultural Research, 262 – 263.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., Sacks, D. L.,** (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of Experimental Medicine* 188, 1941 – 1953.
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., Sacks, D.,** (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *The Journal of Immunology* 165, 969 – 977.
- Berdjane – Brouk, Z., Koné, A., K., Djimdé, A., A., Charrel, R., N., Ravel, Ch., Delaunay, P., del Giudice, P., Diarra, A., Z., Doumbo, S., Goita, S., Thera, M., A., Depaquit, J., Mart, P., Doumbo, O., K., Izri, A.,** (2012). First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Spelaemyia)* darlingi from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. *Plos One* 7.
- Bern, C., Joshi, A. B., Nath Jha, S., Lal Das, M., Hightower, A., Thakur, G. D., Bahadur Bista, M.,** (2000). Factors associated with leishmaniasis in Nepal: Bed – net use is strongly protective. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 63, 184 – 188.
- Blackwell, J. M.,** (1996). Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Symposia of the British Society for Parasitology* 33: Genetics of host and parasite: implications for immunity, epidemiology and evolution. S67-S74.
- Boakye, D. A., Wilson, M. D., Kweku, M.,** (2005). A review of leishmaniasis in West Africa. *Ghana Medical Journal* 39, 94 – 97.
- Boisseau – Garsaud, A. M., Cales – Quist, D., Desbois, N., Jouannelle, J., Jouannelle, A., Pratlong, F., Dedet, J. P.,** (2000). A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94, 51 – 52.
- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C., Maroli, M.,** (2003). Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica* 88, 109 – 116.
- Bounoua, L., Kahime, K., Houti, L., Blakey, T., Ebi, K. L., Zhang, P., Imhoff, M. L., Thome, K. J., Dudek, C., Sahabi, S. A., Messouli, M., Makhoul, B., El Laamrani, A., Boumezzough, A.,** (2013). Linking Climate to Incidence of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (*L. major*) in Pre-Saharan North Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, 3172-3191.
- Burniston, I., Roy, L., Picado, A., Das, M., Rijal, S., Rogers, M., Coosemans, M., Boelaert, M., Davies, C., Cameron, M.,** (2010). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Identify Host-Feeding Preferences of *Phlebotomus* Species (Diptera: Psychodidae) in Endemic Foci of Visceral Leishmaniasis in Nepal. *Journal of Medical Entomology* 47, 902 – 906.
- Cambell – Lendrum, Pinto, M. C., Brandao – Filho, S. P., Desouza, A. A., Ready P. D., Davies, C. R.,**

(1999). Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). *Medical and Veterinary Entomology*, 13, 299 – 309.

Castiglia, R., Bekele A., Makundi, R., Ouge, N., Corti, M., (2006). Chromosomal diversity in the genus *Arvicanthis* (Rodentia, Muridae) from EastAfrica: a taxonomic and phylogenetic evaluation. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44, 223 – 235.

Colluzi, M., Concetti, A., Ascoli, F., (1982). Effect of cibarial armature of mosquitoes (Diptera, Culicidae) on blood-meal haemolysis. *Journal of Insect Physiology* 28, 885-888.

Constantini, C., Gibson, G., Sagnon, N. F., Della Torre, A., Brady, J., Coluzzi, M., (1996). Mosquito responses to carbon dioxide in B West African Sudan savanna village. *Medical and Veterinary Entomology* 10, 220 – 227.

Courtenay, O., Quinnell, R. J., Garcez, L. M., Dye, C., (2002). Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *Journal of Infectious Diseases* 186, 1314 – 1320.

Dantas – Torres, F., (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology* 149, 139 – 146.

Dedet, J. P., Desjeux, P., Derouin, F., (1980). Ecologie d'un foyer de leishmaniose cutanee dans la region de Thies (Senegal, Afrique de l'Ouest). 4.—Infestation spontanee et biologie de *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 73, 266-276.

Dedet, J. P., Derouin, F., Hubert, B., Schnur, L. F., & Chance, M. L., (1979). Isolation of *Leishmania major* from *Mastomys erythroleucus* and *Tatera gambiana* in Senegal (West Africa). *Annals of Tropical*, 433-437.

Desjeux, P., (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 27, 305 – 318.

Díaz – Sáez, V., Merino – Espinosa, G., Morales – Yuste, M., Corpas – López, V., Pratlong, F., Morillas – Márquez, F., Martín – Sánchez, J., (2014). High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infections in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and synanthropic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: Epidemiological consequences. *Veterinary Parasitology* 202, 119 – 127.

Dubrovsky, Y. A., (1975). Ecological causes of predominance of some mammals as reservoirs of *Leishmania tropica major* in Turanian deserts. *Folia Parasitologica* 22, 163 – 169.

Duplantier, J., Sene, M., (2000). Rodents as reservoir hosts in the transmission of *Schistosoma mansoni* in Richard-Toll, Senegal, West Africa. *Journal of Helminthology* 74, 129-135.

Elfari, M., Schnur, L. F., Strelkova, M. V., Eisenberger, C. L., Jacobson, R. L., Greenblatt, C. L., Presber, W., Schonian, G., (2005). Genetic and biological diversity among populations of *Leishmania major* from Central Asia, the Middle East and Africa. *Microbes and Infections*, 7, 93 - 103.

El - Hassan, A. M., Zijlstra, E. E., (2001). 1. Cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95, S1 – S17.

El - Hassan, A. M., Zijlstra, E. E., SEO, M., Ismail, A., (1993). Identification of *Leishmania donovani*, using a polymerase chain reaction in patients and animal material from an area of endemic kala-azar in the Sudan. *Acta Tropica* 55, 87 - 90.

Elnaiem, D. A., Hassan, M. M., Maingon, R., Nureldin, G. H., (2001). The Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Parasitology* 122, Cambridge University Press, 531 – 536.

Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., Shaw, J. J., (2016). An appraisal of

the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology, 1-13.

Faber, W. R., Oskam, L., van Gool, T., Kroon, N. C. M., Knecht-Junk, K. J., Hofwegen, H., van der Wal, A. C., Kager, P. A., (2002). Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. Journal of the American Academy of Dermatology 49, 70-74.

Feiz-Haddad, M. H., Kassiri, H., Kasiri, N., Panahandeh, A., Lofti, M., (2015). Prevalence and epidemiological profile of acute cutaneous leishmaniasis in an endemic focus, Southwest Iran. Journal of Acute Disease 4, 292-297.

Fichet-Calvet, E., Jomâa, I., Ben Ismail, R., Ashford, R. W., (2003). *Leishmania major* infection in the fat sand rat *Psammomys obesus* in Tunisia: interaction of host and parasite populations. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 97, 593 – 603.

Gebre – Michael, T., Balkew, M., Berhe, N., Hailu, A., Mekonnen, Y., (2010). Further studies on the phlebotomine sandflies of the kala-azar endemic lowlands of Humera - Metema (north-west Ethiopia) with observations on their natural blood meal sources. Parasites & Vectors 3 :6.

Gebresilassie, A., Yared, S., Aklilu, E., Kirstein, O. D., Moncaz, A., Tekie, H., Balkew, M., Warburg, A., Hailu, A., Gebre-Michael, T., (2015). Host choice of *Phlebotomus orientalis* (Diptera: Psychodidae) in animal baited experiments: a field study in Tahtay Adiyabo district, northern Ethiopia. Parasites & Vectors 8: 190.

Githure, J. I., Ngumbi, P. M., Anjili, C. O., Lugalia, R., Mwanyumba, P. M., Kinoti, G. K., Koech, D. K., (1996). Animal reservoirs of leishmaniasis in Marigat, Baringo District, Kenya. East African Medical Journal 73, 44 – 47.

Githure, J. I., Schnur, L. F., Le Blancq, S. M., & Hendricks, L. D., (1986). Characterization of Kenyan *Leishmania* spp. and identification of *Mastomys natalensis*, *Taterillus emini* and *Aethomys kaiseri* as new hosts of *Leishmania major*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 501-507.

Goto, H., Lindoso, J. A. L., (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Review of Anti-Infective Therapy 8:4, 419-443.

Gomes, A. H. S., Armelin, I. M., Menon, S. Z., Pereira- Chioccola, V. L., (2008). *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. Experimental Parasitology 119, 319 -324.

Gramiccia, M., (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti - vectorial prophylaxis. Veterinary Parasitology 181, 23 – 30.

Gramiccia, M., Gradoni, L., (2005). The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. International Journal for Parasitology 35, 1169-1180.

Gramiccia, M., Gradoni, L., (2007). The Leishmaniases of Southern Europe, V: Takken, W., Knols, B., Emerging pests and vector – borne diseases in Europe, Ecology and control of vector – borne diseases. Academic Publisher, 75 – 95.

Grimaldi Jr., G., Kreutzer, R.D., Hashiguchi, Y., Gomez, E.A., Mimory, T., Tesh, R.B., (1992). Description of *Leishmania equatoriensis* sp. n. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 87, 221–228.

Guarga, J. L., Lucientes, J., Peribanez, M. A., Molina, R., Gracia, M. J., Castillo, J. A., (2000). Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. Acta Tropica 77, 203 – 207.

Haile, T. T., Lemma, A., (1977). Isolation of parasites from *Arvicanthi*s in Ethiopia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 71, 180 – 181.

Hailu, A., Di Muccio, T., Abebe, T., Hunegnaw, M., Kager, P.A., Gramiccia, M., (2006).

Isolation of *Leishmania tropica* from an Ethiopian cutaneous leishmaniasis patient. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 100, 53–58.

Hanafi, H. A., El -Din, El – S., M. N., El – Hossary, S. S. I., Kaldas, M. R., Villinski, J. T., Furman, B. D., Fryauff, D. J., (2013). Experimental acquisition, development, and transmission of *Leishmania tropica* by *Phlebotomus duboscqi*. Acta Tropica 125, 37- 42.

Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y., Schwartz, R. A., (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. Journal of the American Academy of Dermatology 73, 911-926.

Haouas, N., Bernard, P., Boudabous, R., Dedet, J. P., Babba, H., Ravel, C., (2007). Development of a Molecular Tool for the Identification of *Leishmania* Reservoir Hosts by Blood Meal Analysis in the Insect Vectors. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 77, 1054 – 1059.

Harre, J. G., Dorsey, K. M., Armstrong, K. L., Burge, J. R., Kinnamon, K. E., (2001). Comparative fecundity and survival rates of *Phlebotomus papatasi* sandflies membrane fed on blood from eight mammal species. Medical and Veterinary Entomology 15, 189 – 196.

Hassan, M. M., Osman, O. F., El-Raba'a, F. MA., Schallig, H. DFH, Elnaiem. D. E. A., (2009). Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. Parasites & Vectors 2: 26.

Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., (2002). Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. Emerging Infectious Diseases 8, 1468–1473.

Heisch, R. B., Grainger, W. E., Harvey, A. E. C., (1959). The isolation of *Leishmania* from gerbils in Kenya, Journal of Tropical Medicine and Hygiene 62, 158–159.

Herwaldt, B. L., (1999). Leishmaniasis. The Lancet 354, 1191 – 1199.

Hoogstraal, H., Heyneman, D., (1969). Leishmaniasis in the Sudan Republic, 30. Final Epidemiologic Report. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 18, 1091 – 1210.

Chagas, A. C., Medeiros, J. F., Justiniano, S. C. B., Pessoa, F. A. C., (2007). Haematophagic behavior in laboratory of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae) in relation to three mammalian blood sources in Manaus, Brazil. Acta Amazonica 37, 127 – 132.

Chance, M. L., Schnur, L. F., Thomas, S. C., Peters, W., (1978). The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania* the from the Aethiopian zoogeographical region of Africa. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 72, 533 – 542.

Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., Boelaert, M., (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. Nature Reviews Microbiology 5, 873-882.

Chaves, L. F., Pascual, M., (2006). Climate Cycles and Forecasts of Cutaneous Leishmaniasis, a Nonstationary Vector-Borne Disease. PLOS Medicine 4 (3): e123.

Chaves, L. F., Hernandez, M. J., Dobson, A. P., Pascual M., (2007). Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. Trend in Parasitology 23, 311-316.

IUCN Red List of Threatened Species, (2016). *Arvicanthus neumanni* [online]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/2148/0>.

Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R., (2014). Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain?. Veterinary Parasitology 202, 296 – 300.

Kaabi, B., Ben – hadj Ahmed, S., (2013). Assessing the effect of zooprofylaxis on zoonotic cutaneous leishmaniasis transmission: A systém dynamich approach. BioSystems 114, 253 – 260.

Kamhawi, S., (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. Trends in Parasitology 22. 439 – 445.

Kamhawi, S., (2011). Seasonality and prevalence of *Leishmania major* infection in *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire from two neighboring villages in Central Mali. Plos Neglected Tropical Disease 5.

- Kassahun, A., Sadlova, J., Benda, P., Kostalova, T., Warburg, A., Hailu, A., Baneth, G., Volf, P., Votypka, J., (2015). Natural infections of bats with *Leishmania* in Ethiopia. *Acta Tropica* 150, 166 – 170.
- Kassahun, A., Sadlova, J., Dvorak, V., Kostalova, T., Rohousova, I., Frynta, D., Aghova, T., Yasur – Landau, D., Lemmna, W., Hailu, A., Baneth, G., Warburg, A., Volf, P., Votypka, J., (2015). Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents. *Acta Tropica* 145, 39 – 44.
- Kelly, P., Baudry, T., Peyron, F., (2012). Imported cutaneous leishmaniasis in a short-term traveler returning from Central Mali- The role of PCR. *The Medicine and Infectious Disease* 10, 97-100.
- Killick – Kendrick, R., (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology* 4, 1 – 24.
- Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Egen, J., Lawyer, P., Fay, M., Kamhawi, S., Sacks, D., (2008). Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105, 10125–10130.
- Kingdon, J., (2005). *The Kingdon Pocket Guide to African Mammals*. Unstriped Grass Rats. Princeton University Press, New Jersey, 138.
- Kwakye – Nuako, G., Mosore, M. T., Duplessis, C., Bates, M. D., Puplampu, M., Mensah – Attipoe, I., Desewu, K., Afegbe, G., Asmah, R. H., Manal, B., (2015). First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. *International Journal for Parasitology* 45, 679 – 684.
- Lawyer, P. G., Ngumbi, P. M., Anjili, C. O., Odongo, S. O., Mebrahtu, Y. B., Githure, J. I., Koech, D. K., Roberts, C. R., (1990). Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43, 31 – 43.
- Le Fichoux, Y., Quaranta, J. F., Aueuvre, J. P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, I., Rousseau, D., Kubar, J., (1999). Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1953 -1957.
- Lehane, M., (2005). *Feeding preferences of blood – sucking insects. V: The Biology of Blood – Sucking in Insects*, Second Edition. Cambridge University Press, 15 – 24.
- Lyimo, I. N., Ferguson, H. M., (2009). Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends In Parasitology* 25, 189 – 196.
- Macedo – Silva, V. P., Martins, D. R. A., Souza de Quieros, V., Pinheiro, M. P., Freire, C. C. M., Quieroz, J. W., Dupnik, K. M., Pearson, R. D., Wilson. M. E., Jeronimo, S. M. B., De Fátima, M., Ximenes, F. M., (2014). Feeding Preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the Sand Fly Vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Journal of Medical Entomology* 51, 237 – 244.
- Maia, C., Dionísio, L., Odete Afonso, M., Neto, L., Cristóvão, J. M., Campino, L., (2013). *Leishmania* infection and host – blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic area, the Algarve Region in Portugal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108, 481 – 487.
- Mansueto, P., Seidita, A., Vitale, G., Cascio, A., (2014). Leishmaniasis in travelers: A literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease* 12, 563 – 581.
- Massawe, A. W., Mrosso, F. P., Makundi, R. H., Mulungu, L. S., (2007). Breeding patterns of *Arvicanthus neumanni* in central Tanzania. *African Journal of Ecology* 46, 320 – 324.
- McGwire, B. S., Satoskar, A. R., (2014). Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *QJM An International Journal of Medicine*, 7-14.
- Meheretu, Y., Sluydts, V., Welegerima, K., Bauer, H., Teferi, M., Yirga, G., Mulungu, L., Haile, M., Nyssen, J., Deckers, J., Makundi, R., Leirs, H., (2014). Rodent abundance, stone bund density and its effects on crop damage in the Tigray highlands, Ethiopia. *Crop Protection* 55, 61 – 67.

- Michalsky, É. M., Rocha, M. Fda Rocha Lima, A. C. V. M., França-Silva, J. C., Pirese, M. Q., Santos Oliveira, F., Silva Pacheco, R., Lopes, S.,** (2007). Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary Parasitology* 147, 67 -76.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andreas, M., Gonzales, F., Castillo, J. A., Lucientes, J., Alvar, J.,** (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88, 491 – 493.
- Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Ariso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J.,** (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology* 190, 268 – 271.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G.,** (2005). Advance in leishmaniasis. *Lancet*, 1561-1577.
- Musser, G., M. Carleton.,** (2006). Superfamily Muroidea, V: Wilson, D., Reeder, D. M., *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, 3rd edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Mutinga, M. J., Basimike, M., Kamau, C.C. , Mutero, C.M.,** (1990). Epidemiology of leishmaniasis in Kenya. Natural host preference of wild caught phlebotomine sandflies in Baringo District, Kenya. *East African Medical Journal* 67, 319 – 327.
- Mutinga, M. J., Kaddu, J. B.,** (1983). Studies on vectors of *Leishmania major* in Kenya. In *Proceedings of the 58th Annual Meeting of the American Society of Parasitologists*, San Antonio, Texas, USA, p. 57.
- Mutinga, M. J., Kyai, F. M., Kamau, C., Omogo, D. M.,** (1986). Epidemiology of leishmaniasis in Kenya – III, Host preference studies using various types of animal baits at animal burrows in Marigat, Baringo District. *International Journal of Tropical Insect Science* 7, 191 – 197.
- Navea – Pérez, M. H., Díaz – Sáez, V., Corpas – López, V., Merino – Espinosa, G., Morillas – Marquéz, F., Martín – Sánchez, J.,** (2015). *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts?. *Parasitology Research* 114, 2363-2370.
- Ngumbi, P.M. , Lrungu, L. W., Robert, L. I., Gordon, D. M., Githure, J. L.,** (1998). Abundances and nocturnal activities of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in termite hills and animal burrows in Baringo District, Kenya. *African Journal of Health Sciences* 5, 28 – 34.
- Noguera, P., Rondón, M., Nieves, E.,** (2006). Effect of blood source on the survival and fecundity of the sandfly *Lutzomyia ovallesi* Ortiz (Diptera: Psychodidae), vector of *Leishmania*. *Biomedica* 26 Suppl 1, 57 – 63.
- Nylén, S., Eidsmo, L.,** (2012). Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* 34, 551-561.
- Packer, C.,** (1983). Demographic changes in a colony of Nile grass rats (*Arvicanthis niloticus*) in Tanzania. *Journal of Mammalogy* 64, 159-161.
- Panagiotakopulu, E.,** (2004). Pharaonic Egypt and the origins of the plague. *Journal of Biogeography* 31,269-275.
- Pasa, S., Vardarli, A. T., Erolc, N., Karakus, M., Tözd, S., Atasoy, A., Cüneyt Balcioglu, I., Emek Tunaa, G., Ermis, Ö. V., Ertabaklarg, H., Özbeld, Y.,** (2015). Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. *Veterinary Parasitology* 212, 389 – 392.
- Peters, W. & Killick-Kendrick, R.,** (1987). The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Volume II. Clinical aspects and control. Academic press, 1-4.
- Quate, L. W.,** (1964). *Phlebotomus* sandflies of the Paloich area in the Sudan (Diptera, Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 1, 213 – 268.

- Qiunnell, R. J., Courtenay, O.,** (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915 – 1934.
- Ramalho-Ortigao, M., Saraiva, E. M., Traub-Csekö, Y. M.,** (2010). Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. *Open Parasitology Journal* 4, 195 – 204.
- Ready, P.D.,** (1979). Factors affecting egg production of laboratory - bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 16(5), 413-423.
- Reithinger, R., Davies, C. R.,** (1999). Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61, 530 – 541.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S.,** (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 581-596.
- Roque, A. L. R., Jansen, A. M.,** (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 3, 251 – 262.
- Rose, K., Curtis, J., Baldwin, T., Mathis, A., Kumar, B., Sakthianandeswaren, A., Spurck, T., Low Choy, J., Handman, E.,** (2004). Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *International Journal of Parasitology* 34, 655–664.
- Ruiz – Fons, F., Ferrogli, E., Gortázar, C.,** (2013). *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004 – 2010. *Eurosurveillance, Europe's journal on infectious disease epidemiology, prevention and control* 18, 35 – 39.
- Sacks, D., Kamhawi, S.,** (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology* 55, 453 – 483.
- Sadlova, J., Hajmova, M., Volf, P.,** (2003). *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 24 – 250.
- Sadlova, J., Price, H. P., Smith, B. A., Votypka, J., Volf, P., & Smith, D. F.,** (2010). The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. *Cellular Microbiology* 12, 1765-1779.
- Sadlova, J., Seblová, V., Votypka, J., Warburg, A., & Volf, P.,** (2015). Xenodiagnosis of *Leishmania donovani* in BALB/c mice using *Phlebotomus orientalis*: a new laboratory model. *Parasites & Vectors* 8:158.
- Sarra, S., Peters, D.,** (2003). Rice yellow mottle virus is transmitted by Cows, Donkeys, and Grass Rats in Irrigated Rice Crops. *Plant Disease* 87, 804-808.
- Seaman, J., Mercer, A. J., Sondorp, H. E., Herwaldt, B.,** (1996). Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Annals of Internal Medicine* 124, 664 – 672.
- Shaw, J. J.,** (1988). Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83 Suppl. 1, 486–490.
- Schenone, H.,** (1999). Xenodiagnosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, 289 – 294.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L.,** (1996). Why is man an unsuitable reservoir for the transmission of *Leishmania major*? *Experimental Parasitology* 82, 298 – 305.
- Silva, E.S., Gontijo, C.M.F., and Melo, M.N.,** (2005). Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends In Parasitology* 21, 550–552.
- St. John, J.,** (2005). *Arvicanthus niloticus*, Animal Diversity Web. [online]. Accessed July 02, 2017 Dostupné z: http://animaldiversity.org/accounts/Arvicanthus_niloticus/
- Strelkova, M. V.,** (1996). Progress in studies on Central Asian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis:

A review. *Folia Parasitologica* 43, 1-6.

Sundar, S., (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health* 4, 849- 854.

Svobodova, M., Votypka, J., Nicolas, L., Volf, P., (2003). *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector

Phlebotomus sergenti. *Microbes and Infections* 5, 361 – 364.

Svobodova, M., Volf, P., Votypka, J., (2006). Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hyraxes (*Procavia capensis*) by the bite of *Phlebotomus arabicus*. *Microbes and Infections* 8, 1691 – 1694.

Talmi – Frank, D., Kede, - Vaanunu, N., King, R., Bar – Gal, G. K., Edery, N., Jaffe, C. L., baneth, G., (2010). *Leishmania tropica* Infection in Golden Jackals and Red Foxes, Israel. *Emerging Infectious Diseases* 16, 1973 – 1975.

Titus, R., Ribeiro, J., (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239, 101-114.

Tomás-Pérez, M., Khaldib, M., Riera, C., Mozo-Leóna, D., Ribasa, A., Hidee, M., Barech, G., Benyettou, M., Seghirib, K., Doudou, S., Fisa, R., (2014). First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria. *Acta Tropica* 134, 44 – 49.

Travi, B. L., Arteaga, L. T., León, A. P., Adler, G. H., (2002). Susceptibility of Spiny Rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 97, 887 - 892.

Travi, B. L., Tabares, C. J., Cadena, H., Ferro, C., Osorio, Y., (2001). Canine visceral leishmaniasis in Colombia: Relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64, 119 – 124.

Valenta, D. T., Killick – Kendrick, R., Killick – Kendrick, M., (2000). Courtship and mating by the sandfly *Phlebotomus duboscqi*, a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the Afrotropical region. *Medical and Veterinary Entomology* 14, 207 – 212.

Vinauger, C., Lahondère, C., Cohuet, A., Lazzari, C. R., Riffell, J. A., (2016). Learning and Memory in Disease Vector Insects. *Trends in Parasitology* 32, 761 – 771.

Volf, P., Rohousova, I., (2006). Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitologica* 53, 161 – 171.

Volf, P., Tesarova, P., Nohynkova, E., (2000). Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Medical and Veterinary Entomology* 14, 251 – 256.

Volf, P., Volfova, V., (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology* 36, S1 – S9.

Volobouev, V. T., Ducroz, J. F., Aniskin, V. M., Britton – Davidian, J., Castiglia, R., Dobigny, G., Cranjon, N., Lombard, M., Corti, M., Sicard, B., Capanna, E., (2002). Chromosomal characterization of *Arvicanthis* species (Rodentia, Murinae) from western and central Africa: implications for taxonomy. *Cytogenetic and Genome Research* 94, 250 – 260.

Ward, R. D., (1977). The colonization of *Lutzomyia flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae), A vector of *Leishmania mexicana amazonensis* in Brazil. *Journal of Medical Entomology* 14, 469–476.

WHO, (2014). Manual for case management of cutaneous leishmaniasis of WHO Eastern Mediterranean Region [online]. Dostupné z:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/120002/1/EMROPUB_2013_EN_1590.pdf

WHO, (2016). Weekly Epidemiological Records [online]. Dostupné z:

<http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>

WHO, (2016). Number of cases of cutaneous leishmaniasis reported, Data by country [online].
Dostupné z: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en>

Workeneh, S., Bekele, A., Balakrishnan, M., (2011). Species diversity and abundance of small mammals in Nechisar National Park, Ethiopia. *African Journal of Ecology* 50, 102 - 108.

First published: 1 November 2011 Full publication history

Yaghoobi-Ershadi, M.R., Akhavan, A.A., Mohebbali, M., (1996). *Meriones libycus* and *Rhombomys opimus* (Rodentia:gerbillidae) are the main reservoir hosts in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90, 503–504.

Yaghoobi – Ershadi, M. R., Javadian, E., (1996). Epidemiological study of reservoir hosts in an endemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Bulletin of The World Health Organization* 74, 587 – 590.

Yaghoobi-Ershadi, M. R., Javadian, Kannani, A., (1995). Host preference pattern of phlebotomine sandflies of Borkhar rural district, Isfahan province, Iran. *Acta Tropica* 60, 155 – 158.

Yaghoobi – Ershadi, M. R., Hanafi – Bojd, A. A., Javadian E., Jafari R., Zahraei – Ramazani, A. R., Mohebbali, M., (2002). A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Saudi Medical Journal* 23, 291 – 294.

8 Přílohy

Příloha 1: *Arvicanthis neumanni* (zdroj: vlastní)



Příloha 2: samec *Arvicanthis niloticus* (zdroj: vlastní)



Příloha 3: Hmotnost (g) experimentálně nakažených samic *A. neumanni* v průběhu pokusu

* - týden nákazy, + - úhyn jedince, NV- neváženo, KP – konec pokusu

SKUPINA 1 XENO <i>L. major</i> FVI								
Označení <i>A. neumanni</i>	<i>H</i>	<i>BN</i>	<i>O</i>	<i>Z</i>	<i>BŘ</i>	<i>PN</i>	<i>Z2</i>	Kontrola bez nákazy
T0*	51	46	45	45	46	47	34	40
T2 PI	50	46	46	46	47	48	36	40
T2 PI	53	47	58	51	48	52	36	41
T3 PI	52	48	57	54	49	53	38	44
T4 PI	57	50	58	54	49	55	39	44
T5 PI	59	50	59	53	48	56	39	44
T6 PI	+	50	57	50	46	55	38	46
T7 PI	NV	49	58	52	45	54	41	46
T8 PI	NV	51	58	55	46	54	42	46
T9 PI	NV	52	59	56	47	55	43	47
T10 PI	NV	51	63	60	47	55	45	50
T11 PI	NV	50	+	60	47	55	46	51
T12 PI	NV	52	NV	58	50	58	46	53
T13 PI	NV	52	NV	58	51	60	46	53
T14 PI	NV	54	NV	58	54	62	48	53
T15 PI	NV	54	NV	56	55	64	48	54
T16 PI	NV	53	NV	52	57	65	48	59
T17 PI	NV	53	NV	52	57	65	48	59
T18 PI	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
T19 PI	NV	60	NV	60	63	72	56	66
T20 PI	NV	59	NV	54	59	69	60	68

SKUPINA 2 BEZ XENO L. major FVI								
Označení A. neumanni	H	LB	O	PB	PZ	HO	LB2	Kontrola bez nákazy
T0*	43	41	43	36	41	39	38	40
T1 PI	44	41	43	37	42	39	39	42
T2 PI	46	47	45	39	44	40	40	44
T3 PI	48	44	48	41	47	42	41	44
T4 PI	50	46	50	42	49	44	43	44
T5 PI	50	47	51	43	49	44	45	46
T6 PI	52	48	51	43	51	44	46	46
T7 PI	52	49	51	44	49	44	46	46
T8 PI	54	50	53	45	49	44	47	46
T9 PI	55	52	55	52	45	46	48	50
T10 PI	KP, 55	52	54	54	45	KP, 47	49	51
T11 PI	NV	52	55	54	46	NV	51	53
T12 PI	NV	53	57	54	47	NV	53	53
T13 PI	NV	55	59	55	48	NV	56	53
T14 PI	NV	55	58	53	46	NV	57	54
T15 PI	NV	58	KP, 63	56	KP, 49	NV	55	59
T16 PI	NV	60	NV	57	NV	NV	56	59
T17 PI	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
T18 PI	NV	64	NV	61	NV	NV	60	66
T19 PI	NV	69	NV	66	NV	NV	61	68
T20 PI	NV	68	NV	65	NV	NV	64	67

SKUPINA 3 XENO L. major LV109							
Označení A. neumanni	H	O	BŘ	PZ	PP	H	Kontrola bez nákazy
T0*	39	46	41	39	44	53	53
T2 PI	39	48	40	39	43	52	55
T4 PI	39	49	43	41	45	54	59
T6 PI	39	53	46	45	46	NV	65
T8 PI	43	54	47	45	47	NV	61
T10 PI	44	54	46	43	47	KP, 53	55
T12 PI	48	58	50	47	51	NV	56
T14 PI	49	59	52	48	52	NV	55
T16 PI	48	61	54	46	50	NV	55
T18 PI	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
T20 PI	50	66	63	50	56	NV	61

**SKUPINA 4 BEZ
XENO L. major
LV109**

Označení A. neumannii	PP	LP	BŘ	BŘH	PZ	PZ2	Kontrola bez nákazy
T0*	54	57	53	57	50	55	53
T2 PI	55	56	55	55	50	56	52
T4 PI	59	57	55	57	52	58	55
T6 PI	61	58	58	62	52	62	57
T8 PI	58	55	57	56	51	62	56
T10 PI	58	56	55	KP, 57	49	+	55
T12 PI	59	57	NV	NV	53	NV	54
T14 PI	56	KP, 57	NV	NV	54	NV	55
T16 PI	54	NV	NV	NV	54	NV	54
T18 PI	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
T20 PI	61	NV	NV	NV	58	NV	57

**SKUPINA 5
XENO L. major
LV110**

Označení A. neumannii	BŘ	LZ	PP	PZ	LP	OBŘ	Kontrola bez nákazy
T0*	51	54	46	56	60	55	56
T2 PI	51	55	47	57	63	59	58
T4 PI	KP, 54	59	50	60	66	60	58
T6 PI	NV	54	49	59	64	59	58
T8 PI	NV	55	50	60	64	60	59
T10 PI	NV	57	+, 51	61	KP, 65	61	60
T12 PI	NV	55	NV	60	NV	63	61
T14 PI	NV	KP, 57	NV	61	NV	62	58
T16 PI	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
T18 PI	NV	NV	NV	64	NV	63	63
T20 PI	NV	NV	NV	67	NV	63	63

